

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. Rolf F. Maier

Titel der Dissertation:

**Interleukin-4 induzierendes Prinzip von  
Schistosoma mansoni Eiern (IPSE):  
Klassisches Antigen oder Superantigen?**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
an dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Dorothea Michels

aus Marburg

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Am 03.02.2011

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Rolf F. Maier

Korreferent: Prof. Dr. M. Schnare

*Meinen Eltern*

## **5Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>01</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>03</b>
2.1 Die allergische Sofortreaktion	03
2.1.1 Definition	03
2.1.2 Systemische Sensibilisierung	04
2.1.3 IgE-vermittelte Mastzelldegranulation	05
2.2 Immunglobuline	07
2.2.1 Struktur der Immunglobuline	07
2.2.2 Entstehung der Vielfalt der Immunglobuline	09
2.2.3 Immunglobulinklassen	12
2.2.4 Bindung von klassischen Antigenen und Superantigenen	12
2.3 Eingeschränktes Antikörperrepertoire im murinen Modell	16
2.3.1 Übersicht	16
2.3.2 Die $\Delta$ -iD Maus	16
2.3.3 Die $\Delta$ -RF2 Maus	17
2.3.4 Bedeutung für die Analyse der Bindung von Antigenen an Immunglobulinen	17
2.4 IPSE (Interleukin-4 introducing Principle of Schistosoma mansoni Eggs)	19
2.4.1 Herkunft und Wirkung	19
2.4.2 Interaktion mit Immunglobulinen, IPSE als alternativer IgE-Ligand (Bedeutung für die allergische Sofortreaktion)	20
2.5 Fragestellung	22
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1 FACS (Fluorescence activated cell sorter)	23
3.1.1 Geräte, Utensilien, Chemikalien	23
3.1.2 Untersuchungsmaterial	25
3.1.3 Methoden	25
3.1.3.1 Materialgewinnung	25
3.1.3.2 Materialaufbereitung	26
3.1.3.3 Herstellen einer identischen Zellkonzentration	26

3.1.3.4 Herstellen der Antikörperverdünnungen	26
3.1.3.5 Färbung	27
3.2 ELISA	31
3.2.1 Geräte, Utensilien, Chemikalien	31
3.2.2 Untersuchungsmaterial	31
3.2.3 Methoden	32
3.2.3.1 Materialgewinnung und Sensibilisierung	32
3.2.3.2 Herstellen der Antikörperverdünnungen und Puffer	33
3.2.3.3 Coating	34
3.2.3.4 Aufbringen der Standardreihen und des Mausserums	35
3.2.3.5 Aufbringen der Sekundär- und Tertiärantikörper	36
3.2.3.6 Entwickeln, Stoppen und Messen	36
3.2.3.7 Bestimmung des Gesamtgehalts an Immunglobulinen	36
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1 FACS	38
4.1.1 Übersicht	38
4.1.2 Verschiedene Gewebe	40
4.1.2.1 Wildtypmäuse	40
4.1.2.2 $\Delta$ -iD Mäuse	42
4.1.2.3 $\Delta$ -RF2 Mäuse	43
4.1.3 Verschiedene Mauslinien	45
4.1.3.1 Milz	45
4.1.3.2 PCL	47
4.1.3.3 Peyer-Plaques	48
4.2 ELISA	50
4.2.1 Übersicht	50
4.2.2 IgM	50
4.2.2.1 Absolute OD IPSE-bindender IgM	50
4.2.2.2 Relative OD IPSE-bindender IgM im Verhältnis zu Gesamt IgM	52
4.2.3 IgG <sub>1</sub>	52

4.2.3.1 Absolute OD IPSE-bindender IgG <sub>1</sub>	52
4.2.3.2 Relative OD IPSE-bindender IgG <sub>1</sub> im Verhältnis zu Gesamt IgG <sub>1</sub>	53
<b>5. Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1 Kritische Betrachtung des murinen Modells	56
5.2 IPSE-bindende B-Lymphozyten verschiedener Mauslinien	57
5.3 IPSE-bindende Immunglobuline	58
5.4 IPSE-bindende B-Lymphozyten verschiedener Gewebe	59
5.5 Immunologische Bedeutung	60
5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	61
5.7 Schlussfolgerung	63
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>74</b>
7.1 Tabelle Mäuse	74
7.2 Abbildungsverzeichnis	79
7.3 Publikationen	80
7.4 Ehrenwörtliche Erklärung	81
7.5 Verzeichnis der Akademischen Lehrer	82
7.6 Curriculum vitae	83
7.7 Danksagung	86

## 1. Zusammenfassung

Die häufigsten allergischen Erkrankungen sind Asthma bronchiale, Neurodermitis und allergische Rhinitis. Diese Krankheiten nehmen an Inzidenz zu, sind für Betroffene sehr belastend und können lebensbedrohlich werden. Aktuelle Forschungsprojekte zielen darauf ab, die Mechanismen der Allergieentstehung besser zu verstehen, um dann spezifische Therapien entwickeln zu können. Die akute allergische Reaktion vom Typ I wird über IgE-Freisetzung vermittelt. Ein wichtiger Mechanismus hierbei ist die systemische Sensibilisierung bei einem Antigenkontakt und die folgende Aktivierung von Mastzellen bei erneutem Antigenkontakt durch Quervernetzung von Mastzell-gebundenem IgE, was zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt.

Im Gegensatz zu klassischen Allergenen führt das Peptid *Interleukin-4 induzierendes Prinzip von Schistosoma mansoni Eiern* (IPSE) aus Schistosomeneiern schon beim ersten Antigenkontakt zur Mastzelldegranulation. Es bindet an Mastzell-gebundenes IgE, ohne dieses jedoch querverzuzusetzen und weist damit andere Wege der Mastzellaktivierung auf als die bereits bekannten über eine systemische Sensibilisierung.

Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass IPSE sowohl am  $F_c$ - als auch am  $F_{ab}$ -Teil von IgE binden kann. Beide Bindungen sind für die Mastzelldegranulation relevant. Es ist unklar, ob die Bindung an den  $F_{ab}$ -Teil über eine klassische Bindung oder eine Superantigenbindung erfolgt. Bei der Superantigenbindung bindet das Antigen an der Stelle des Antikörpers, die durch die *Framework-Region* des Variablen ( $V_H$ )  $F_{ab}$ -Teils kodiert wird. Die  $V_H$ -Gensegmente werden in sieben Familien eingeteilt. Durch ein Superantigen werden in der Regel alle B-Lymphozyten aktiviert, die  $V_H$ -Gene einer Familie exprimieren. Bei der klassischen Antigenbindung werden durch Bindung an die hypervariable „*complementarity determining region*“ des  $F_{ab}$ -Teils nur sehr wenige Zellen aktiviert.

Die Fragestellung der folgenden Arbeit war, ob IPSE nach dem klassischen Prinzip oder als Superantigen bindet.

Hierfür wurde die IPSE-Bindung durch B-Lymphozyten untersucht, die aus Mäusen stammten, die in ihrem Antikörperrepertoire eingeschränkt waren. Dabei wurden Wildtyp Balb/c Mäuse verglichen mit solchen, die überwiegend hydrophobe Aminosäuren in der klassischen Antigenbindungsstelle besitzen (=  $\Delta$ -RF2 Maus) und mit solchen, die dort überwiegend geladene Aminosäuren besitzen ( $\Delta$ -iD Maus). Sollte die IPSE-Bindung über die klassische Stelle zustande kommen, so wäre ein Unterschied bei den verschiedenen Mauslinien zu erwarten. Bei einer Superantigenbindung wären keine Unterschiede zu erkennen.

Wir etablierten Methoden zur Messung des Anteils IPSE-bindender B-Lymphozyten mittels FACS-Analyse und der IPSE-bindenden Antikörper mittels ELISA und konnten zeigen, dass es zwischen den verschiedenen Mauslinien keinen Unterschied in der IPSE-Bindungsfähigkeit gibt. Daraus lässt sich ableiten, dass die IPSE-Bindung höchstwahrscheinlich als Superantigen erfolgt. Dies erklärt die Mastzellaktivierung durch IPSE schon beim ersten Antigenkontakt. Weiterhin zeigte sich, dass die B-Lymphozyten der Peyer-Plaques des Darms einen geringeren Anteil IPSE-bindender Zellen enthalten als die der Milz und der Peritonealhöhle.



## 2. Einleitung

### 2.1 Die allergische Sofortreaktion

#### 2.1.1 Definition

Allergien spielen in unserer heutigen Zeit eine zunehmende Rolle. Die Inzidenz atopischer Erkrankungen wie Neurodermitis, Asthma bronchiale oder allergische Rhinitis steigt in den Industrieländern (Bach 2002). Neueste Studien zeigen, dass 10% der Kinder in industrialisierten Ländern an Asthma bronchiale leiden (Eder *et al.* 2006). Die Gründe für diesen Anstieg der Inzidenz sind letztlich unklar. Die „Hygiene-Hypothese“ besagt, dass ein Mangel an Infektionen und ein verringerter Kontakt mit Bakterien und Parasiten zu einer fehlgesteuerten Immunantwort im Sinne einer Imbalance des  $T_H1$  /  $T_H2$  – (T –Helfer –Zellen Typ 1 und Typ 2) Gleichgewichts (s. Kap.2.1.2) zugunsten der  $T_H2$ -Zellen führt (Maddox und Schwartz 2002). Nach Coombs und Gell werden vier Typen der „allergischen Reaktionen“ unterschieden (Janeway *et al.* 2005). Beim Typ I wird die Reaktion über IgE vermittelt. Dieses ist an Mastzellen gebunden. Bei Bindung des passenden löslichen Antigens kommt es zur Mastzelldegranulation. Dieser Typ findet sich z.B. bei allergischer Rhinitis, Asthma bronchiale und systemischer Anaphylaxie.

Typ II ist IgG-vermittelt. Die Antikörper binden an Oberflächenantigene der jeweiligen Zellart. In der Folge kommt es zur Komplementaktivierung und Zerstörung der Zelle. Dieser Typ findet sich meist bei Medikamentenunverträglichkeit und chronischer Urtikaria. Bei Typ III wird die Reaktion durch Antigen-Antikörper (IgG)–Komplexe vermittelt. Die Komplexe lagern sich insbesondere an Basalmembranen ab und führen hier zur Komplement- und Phagozytenaktivierung. Dieser Typ tritt bei Krankheiten wie dem Goodpasture – Syndrom auf. Der Typ IV ist T-Zell-vermittelt und wird noch weiter unterteilt. Bei der Kontaktdermatitis kommt es über  $T_H1$ -Zellen zur Makrophagenaktivierung. Bei der verzögerten Reaktion des chronischen Asthmas kommt es über  $T_H2$ -Zellen zur IgE-Produktion, Eosinophilenaktivierung und Mastozytose (Janeway *et al.* 2005). Eine zentrale Rolle in der Typ 1-Allergie spielt das IgE. Es vermittelt die allergische Sofortreaktion und seine Produktion wird durch die verzögerte allergische Reaktion gefördert. Allerdings können Reaktionen mit dem typischen

Phänotyp der Typ-1-Allergie auch in Abwesenheit einer klassischen allergischen Sensibilisierung stattfinden, z.B. bei Parasitenbefall. Daher wurde postuliert, dass es neben der Allergen-vermittelten Reaktion auch einen alternativen Mechanismus geben könnte, der die Mastzelldegranulation und anschließende Reaktion auslöst. Dies ist insbesondere interessant, weil Parasitenbefall vor der allergischen Sensibilisierung schützen kann (Dittrich *et al.* 2008). In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein alternativer, Allergen-unabhängiger Mechanismus der Mastzelldegranulation durch ein Parasitenantigen, das Interleukin-4 induzierende Prinzip aus *Schistosoma mansoni* Eiern (IPSE), untersucht.

### 2.1.2 Systemische Sensibilisierung

Die Voraussetzung für eine allergische Typ I-Allergie nach Coombs und Gell ist die vorherige Sensibilisierung gegen das jeweilige Antigen (Janeway *et al.* 2005). Zunächst wird hierbei das Antigen von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, nachdem es die Epithelbarriere durchbrochen hat (Maddox *et al.* 2002). Diese Zellen zerlegen das Antigen in Peptidfragmente und wandern zu Lymphknoten, wo sie diese Fragmente mithilfe des MHC II (major histocompatibility complex II) B- und T-Lymphozyten und anderen Immunzellen präsentieren (Busse und Lemanske Jr. 2001). Sind die Rezeptoren der Lymphozyten spezifisch für das jeweilige Antigen, werden die Zellen aktiviert (Holt *et al.* 1999; Maddox *et al.* 2002). Der weitere Verlauf der Immunreaktion hängt entscheidend von den T-Helfer-Zellen ab. Dabei sezernieren T<sub>H</sub>1-Zellen und T<sub>H</sub>2-Zellen unterschiedliche Zytokine, wodurch die Reaktion in zwei unterschiedliche Richtungen laufen kann.

T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren vor allem Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), T<sub>H</sub>2-Zellen dagegen IL-4, IL-5 und IL-13 (Abbas *et al.* 1996; Holgate *et al.* 1999). Allergene prägen die Immunantwort im Sinne eines T<sub>H</sub>2-Phänotyps (Corry *et al.* 1999). Als Ursachen hierfür werden verschiedene Faktoren vermutet. Dazu zählen genetische Faktoren, die Beschaffenheit des Antigens (Janeway *et al.* 2005) sowie Umwelteinflüsse (Maddox *et al.* 2002). Unter dem Einfluss des T<sub>H</sub>2-Zytokinmusters kommt es zur Eosinophilenansammlung im Gewebe und zum Isotypenwechsel der Immunglobuline der allergenspezifischen Plasmazellen hin zu IgE und IgG<sub>4</sub> (beim Menschen) beziehungsweise IgG<sub>1</sub> (bei der Maus) (Corry *et al.* 1999; Busse *et al.*

2001; Janeway *et al.* 2005). So kommt es zur Produktion allergenspezifischen IgEs und damit zur Ausbildung einer allergischen Krankheit (Laitinen *et al.* 2004, Moffatt *et al.* 2007, Hui *et al.* 2008).

Die physiologische Rolle des IgE ist nicht vollständig geklärt. Es ist bei der Eliminierung von Parasiteninfektionen beteiligt. Dies könnte einen Bezug zur „Hygiene-Hypothese“ aufwerfen, da laut dieser zu wenig Kontakt zu infektiösen Substanzen eine Ursache der steigenden Inzidenz der Allergien in Industrieländern ist. Laut „Dschungel-Hypothese“ könnte hierbei insbesondere parasitären Würmern eine große Bedeutung zukommen. So könnte eine Reaktion, die physiologischerweise gegen Parasiten gerichtet ist, gegen harmlose Umweltantigene zustande kommen. Jedoch zeigen einige Studien, dass IgE nicht absolut notwendig für die allergische Reaktion ist. IgE wurde in 200 Millionen Jahren Evolution stark konserviert, was auf eine einzigartige Rolle im Immunsystem schließen lässt, die jedoch nicht endgültig geklärt ist (Achatz *et al.* 2006).

### 2.1.3 IgE-vermittelte Mastzelldegranulation

Das durch den Immunglobulin-Isotypenwechsel unter  $T_H2$ -Zytokineinfluss gebildete IgE wird größtenteils an Mastzellen und basophile Granulozyten gebunden. Diese Bindung erfolgt über den  $F_{c\epsilon}RI$ . Dies ist ein Rezeptor in der Membran der Mastzellen, der mit hoher Affinität den  $F_c$ -Teil des IgE bindet (Beaven *et al.* 1993, Bieber 1993). Wenn IgE an diesem Rezeptor gebunden ist, ändert es seine Konformation. Ungebunden wird es mit einem Taschenmesser verglichen (im Gegensatz zum Y-förmigen IgG). Bei der Bindung am Rezeptor „rastet es ein“. Dies führt zu der hoch affinen Bindung am  $F_{c\epsilon}RI$  (Wan *et al.* 2002). Mastzellen sind mononukleäre Zellen, die dem Knochenmark entstammen. Sie sind an strategisch wichtigen Stellen des Körpers lokalisiert, an denen es bevorzugt zum Antigenkontakt kommt (Haut, Schleimhäute). Kommt es nach der primären Sensibilisierung zu erneutem Antigenkontakt wird das Antigen an IgE auf Mastzellen gebunden und IgE-Moleküle werden quervernetzt, wodurch die Mastzelle aktiviert wird. Daraus folgt die Mastzelldegranulation, bei der proinflammatorische Faktoren wie Histamin, Serotonin, Heparin und verschiedene Proteasen freigesetzt werden (Lane und Lee 1997).

Durch diese Mediatoren kommt es zur Kontraktion glatter Muskulatur (z.B. in den Bronchien), zu vermehrter Durchblutung und erhöhter Kapillarpermeabilität, was zu einem Ödem führt (Janeway *et al.* 2005), sowie zur Gewebszerstörung. Weiterhin tragen neu synthetisierte und dann sezernierte Prostaglandine, Leukotriene und PAF (*platelet-activating factor*) zu dieser Reaktion bei. Diese Vorgänge bilden die allergische Sofortreaktion vom Typ I nach Coombs und Gell. Es werden auch IL-4 und IL-13 von der Mastzelle sezerniert, welche die  $T_H2$ -Reaktion aufrechterhalten. Einige Mediatoren dienen der Chemotaxis von eosinophilen und basophilen Granulozyten und  $T_H2$ -Zellen (Janeway *et al.* 2005). Der entscheidende Faktor für die allergische Reaktion Typ I ist die Bindung des Antigens an mastzellgebundenes IgE und die folgende Quervernetzung der IgE-Moleküle. Bei Gesunden ist der IgE-Blutspiegel sehr niedrig im Bereich von Nanogramm pro Milliliter (van den Stoep *et al.* 1993, Efremov *et al.* 1993, Tilgner *et al.* 1997). Bei Allergikern findet man dagegen meist erhöhte Spiegel an allergenspezifischem IgE (Holt *et al.* 1999; Maddox *et al.* 2002). Daraus leitet sich ein neuer Therapieansatz zur Behandlung von Allergien ab, der Einsatz monoklonaler anti-IgE-Antikörper (Omalizumab). Die klinische Wirksamkeit dieser Therapie wird derzeit intensiv untersucht (Strunk *et al.* 2006). Die Behandlung ist hierbei generell gegen das gesamte IgE gerichtet.

Eine gezieltere Behandlung wäre möglich, wenn man gegen das allergenspezifische IgE vorgehen könnte. Dafür ist es wichtig herauszufinden, wie das Allergen am IgE bindet. Es gibt grundsätzlich zwei Arten, wie ein Antigen binden kann: als klassisches Antigen oder als Superantigen (s. Kap. 2.2.3). Es wurde aufgrund molekulargenetischer Untersuchungen die Hypothese aufgestellt, dass einige Allergene als B-Zell-Superantigene binden (Marone *et al.* 2006). In der Blockierung von B-Zell-Superantigenbindungsstellen könnte ein weiterer Therapieansatz für die Behandlung von Allergien liegen. Dafür ist es jedoch wichtig, die genaue Struktur der Immunglobuline und ihre Bindungsstellen zu kennen.

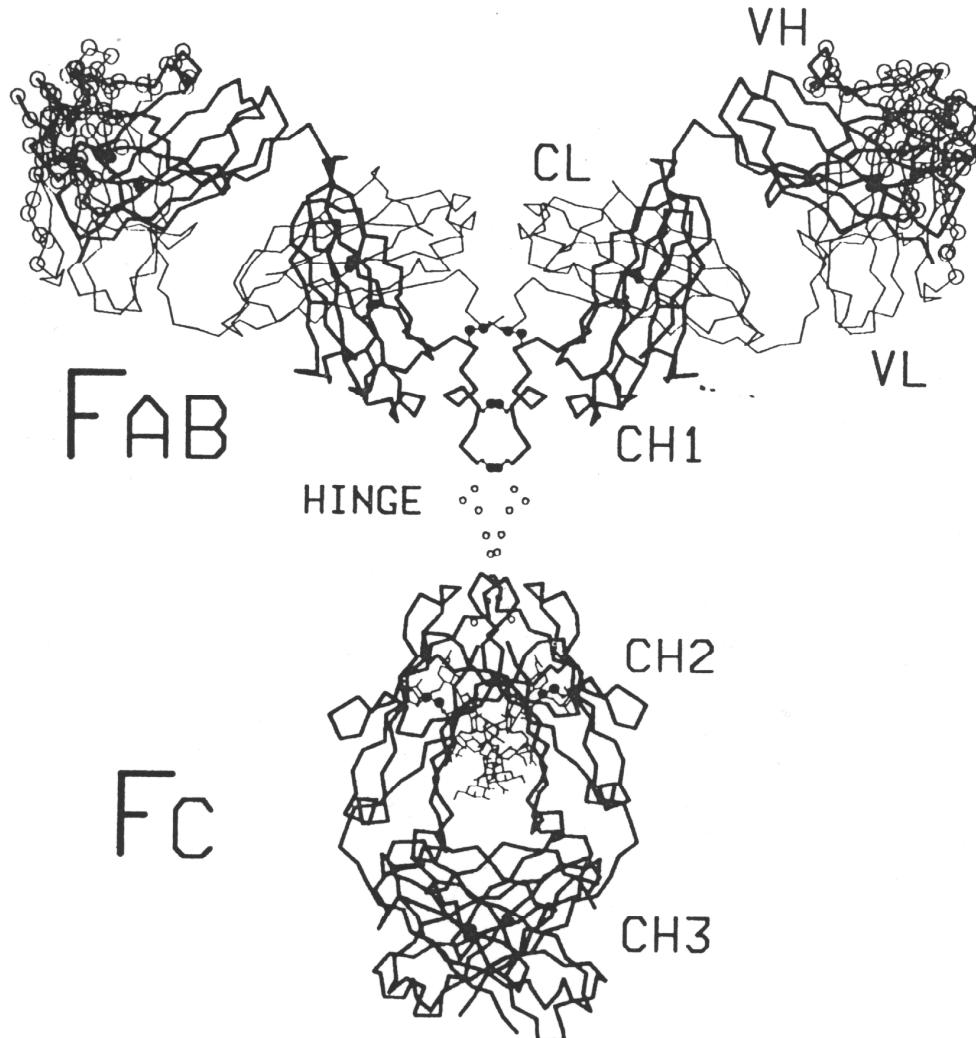
## 2.2 Immunglobuline

### 2.2.1 Struktur der Immunglobuline

Immunglobuline sind Glykoproteine, die der Bindung und Erkennung von Antigenen dienen. Sie kommen membrangebunden auf B-Lymphozyten als Rezeptoren vor (B-Zell-Rezeptor). Sie können aber auch sezerniert werden und kommen dann im Blut und in Gewebsflüssigkeiten vor. Dort dienen sie vor allem der Opsonierung und damit Inaktivierung pathogener Agenzien. Immunglobuline bestehen aus zwei identischen leichten Ketten mit ca. 25 kDa und zwei identischen schweren Ketten mit ca. 50 kDa. Die beiden schweren Ketten sind untereinander sowie mit jeweils einer leichten Kette über Disulfidbrücken verbunden. Es werden verschiedene dreidimensionale Strukturen, die Domänen oder Regionen, unterschieden. Diese bestehen aus ähnlichen Nukleotidsequenzen mit jeweils ca. 110 Aminosäuren (AS). In jeder Kette gibt es eine variable Region und eine oder mehrere konstante Regionen. Die variable Region dient der spezifischen Antigenbindung, die konstante bestimmt die Immunglobulinklasse (Janeway *et al.* 2005).

Bei den leichten Ketten werden zwei Typen unterschieden, die lambda  $\lambda$  und die kappa  $\kappa$  – Kette. In einem Immunglobulin findet sich entweder die eine oder die andere Kette, nie beide gleichzeitig. Es konnte bisher kein funktioneller Unterschied zwischen beiden Ketten festgestellt werden. Für das speziesspezifische Verhältnis gibt es keine Erklärung (Janeway *et al.* 2005). Die leichten Ketten bestehen aus je einer variablen  $V_L$  und einer konstanten  $C_L$ -Region. Die schwere Kette bestimmt die Klasse und damit die Funktion des Immunglobulins. Es gibt fünf verschiedene schwere Ketten: Alpha  $\alpha$ , Gamma  $\gamma$ , Delta  $\delta$ , Epsilon  $\epsilon$  und My  $\mu$ . Diese geben den Immunglobulinklassen deren Namen: IgA, IgG, IgD, IgE, IgM (Poljak *et al.* 1976, Cooper 1987, Maizels 2005).

Die schwere Kette enthält jeweils eine variable Region  $V_H$  und mehrere konstante Regionen (IgA, IgD und IgG drei  $C_H$  1-3 Domänen, IgM und IgE vier konstante  $C_H$  1-4 Domänen). Zwischen der ersten und zweiten konstanten Domäne befindet sich eine bewegliche Region (hinge).



**Abb. 1:** Proteintertiärstruktur eines humanen IgG-Moleküls (aus Padlan 1994). Das sezernierte IgG-Molekül besitzt in der schweren Kette vier Domänen mit den Bezeichnungen  $V_H$ ,  $C_H1$ ,  $C_H2$  und  $C_H3$ . Die beiden Domänen der leichten Kette heißen  $V_L$  und  $C_L$ . Die Antigenbindenden **Fab**-Fragmente (Fragment antigen binding) sind über die bewegliche **Hinge**-Region (Scharnier) mit dem **Fc**-Fragment (Fragment crystallizable) verbunden.

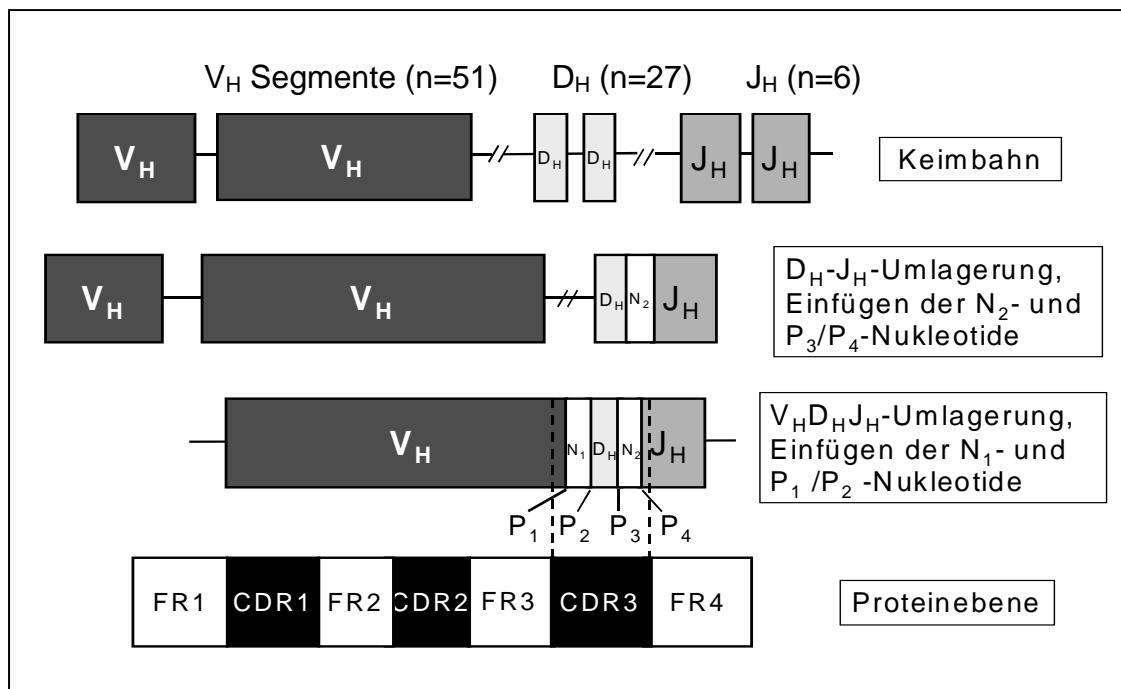
Die dreidimensionale Struktur der Antikörper ist variabel und unterscheidet sich für die verschiedenen Immunglobuline. Am besten ist die Struktur des IgG untersucht. Dieses nimmt im Allgemeinen eine Y-Form an. Über die *hinge*-Region sind die beiden Arme sehr beweglich, so dass der Winkel zwischen beiden Armen variabel ist. Da die variable Region die spezifische Antigenbindungsstelle enthält, ist deren Struktur besonders wichtig. Sie besteht aus  $\beta$ -Faltblättern mit relativ konstanten Aminosäuren, die durch hypervariable Schleifen miteinander verbunden sind. Die konstanten Regionen nennt man auch framework region (FR) und die Schleifen complementarity-determining region (CDR). Es gibt in der schweren und leichten Kette je vier FR (FR1, FR2, FR3, FR4) und drei CDR (CDR1, CDR2, CDR3). Die FRs sind für die strukturelle Intaktheit des Immunglobulins zuständig, die CDRs für die Antigenbindung (Xu *et al.* 2000, Collis *et al.* 2003). Die klassische Antigenbindungsstelle wird also aus sechs Anteilen zusammengesetzt, drei CDRs der leichten und drei CDRs der schweren Kette. Dabei spielt die CDR3 der schweren Kette (CDR-H3) die größte Rolle bei der klassischen Antigenbindung. Sie allein reicht aus, um eine ausreichende Immunglobulin-Diversität für eine protektive Immunantwort zu erzeugen (Padlan *et al.* 1994, MacCallum *et al.* 1996, Xu *et al.* 2000, Collis *et al.* 2003). Die besondere Rolle der CDR-H3-Region wird durch ihre Entstehung während der somatischen Rekombination erklärt.

### 2.2.2 Entstehung der Vielfalt der Immunglobuline

Nahezu jedes Antigen der Umwelt findet seinen Gegenpart in der Antigenbindungsstelle eines Immunglobulins. Diese große Vielfalt direkt in der DNA zu kodieren, würde zu viel Platz einnehmen. Darum findet in der Reifung von der Stammzelle zum reifen B-Lymphozyten eine somatische Rekombination statt. Die Gensegmente für die variable Region der Immunglobuline werden neu kombiniert. Dabei bestehen die Immunglobuline aus verschiedenen Anteilen: Leichte Kette aus  $V_L$  (variable),  $J_L$  (joining),  $C_L$  (constant); schwere Kette aus  $V_H$ ,  $D_H$  (diversity),  $J_H$ ,  $C_H$ . Für jeden dieser Anteile gibt es verschiedene Segmente, von denen jeweils nur eins in einem bestimmten B-Lymphozyten verwendet wird. Der Genloкус für die schwere Kette liegt auf Chromosom 14. Er enthält Sequenzen für 51  $V_H$ -, 27  $D_H$ - und 5  $J_H$ -Segmente sowie die konstanten Regionen  $C\alpha$ ,  $C\gamma$ ,  $C\delta$ ,  $C\epsilon$  und  $C\mu$ .

Das  $V_H$ -Segment stellt mit 288 Nukleotiden den größten Teil der variablen Region, und zwar FR1, FR2, FR3, CDR-H1, CDR-H2 und den 5' Nukleotide der CDR-H3-Region. Die 51  $V_H$ -Segmente werden in sieben Familien eingeteilt ( $V_H$  1-7) in denen die Nukleotidsequenz zu 80% übereinstimmt. Jedem  $V_H$ -Segment ist dabei ein leader L vorangestellt. (Matsuda *et al.* 1998, Cook *et al.* 1995). Die  $V_H$  3 Familie ist dabei die größte, während  $V_H$  5 und 6 nur 1 oder 2 Mitglieder besitzen (Giudicelli *et al.* 2006).

Das  $D_H$ -Segment erhöht die Vielfalt und das  $J_H$ -Segment stellt die Verbindung zur konstanten Region dar. Die CDR-H3-Region wird aus  $V_H$ ,  $D_H$  und  $J_H$  gebildet (Tonegawa *et al.* 1983). Sie ist für verschiedene Immunglobulinklassen unterschiedlich lang. Für IgE (Andréasson *et al.* 2006), IgG (Zemlin *et al.* 2007) und IgA (Bauer *et al.* 2007) ist sie kürzer als für IgM (Yamada *et al.* 1991).



**Abb. 2:** Prinzip der  $V_H$ - $D_H$ - $J_H$ -Umlagerung der schweren Kette des Immunglobulins: Im ersten Schritt wird ein  $D_H$  mit einem  $J_H$  verknüpft. Durch die Umlagerung können P-Nukleotide entstehen und durch das Enzym TdT N-Nukleotide eingefügt werden. Im zweiten Schritt wird an die  $D_H$ - $J_H$ -Sequenz eins von den 51  $V_H$ -Segmenten angelagert. Vor der Translation in das fertige Protein erfolgt die Transkription in m-RNA (hier nicht dargestellt).



Um die verschiedenen Segmente zu rekombinieren wird in der B-Vorläuferzelle jeweils ein Segment aus allen  $V_H$ -,  $D_H$ -,  $J_H$ - und  $C_H$ -Segmenten ausgewählt. Hierfür wichtig sind die rekombinationsaktivierenden Gene RAG-1 und RAG-2, die nur in sich entwickelnden lymphatischen Zellen vorkommen. Der Komplex aus RAG-1 und RAG-2 erkennt eine Rekombinationssequenz (RSS) des ausgewählten Segments, die sich an den Enden eines jeden Exons befindet. Die zwischen den Segmenten liegende DNA wird ausgestülpt. Aus ihr entsteht ein zirkuläres DNA - Fragment, welches im Weiteren abgebaut wird (Pascual *et al.* 1991; Alt *et al.* 1992). Dabei werden an den Enden der zu verbindenden Segmente einige Nukleotide entfernt. Beim Zusammenfügen wird zunächst das  $D_H$ - mit einem  $J_H$ -Segment verknüpft, danach diese Sequenz mit dem  $V_H$ -Segment (Li *et al.* 1993; Rajewski 1996; Chowdhury *et al.* 2004). Weiterhin werden während der Umlagerung durch das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) zwischen den Segmenten bis zu 20 N-Nukleotide eingefügt. Diese erhöhen zusätzlich die Variabilität der Antigenbindungsstelle (junktionale Vielfalt) (Benedict *et al.* 2000). Wenn man bedenkt, dass die gesamte Junktionszone in der CDR-H3-Region liegt, erklärt sich hieraus deren hervorragende Rolle in der Antigenbindung.

Bei  $\frac{2}{3}$  der Umlagerungen entstehen Verschiebungen des Leserasters. Dadurch entstehen funktionsunfähige Proteine. Diese B-Zellen gehen durch Apoptose zugrunde oder werden durch Umlagerung eines weiteren  $V_H$ -Segments ( $V_H$ -replacement) wieder funktionsfähig gemacht (Zhang *et al.* 2003). Als Nächstes werden die Segmente der leichten Kette rekombiniert. Deren CDRs haben eine geringere Vielfalt als die der schweren Kette. Zum einen haben sie keine D-Segmente und weniger  $V_L$ - und  $J_L$ -Segmente zur Auswahl. Für die  $\kappa$ -Kette existieren 40  $V_L$ - und 5  $J_L$ -Segmente, für die  $\lambda$ -Kette 30  $V_L$ - und 4  $J_L$ -Segmente. Zum anderen werden in der Junktionszone selten N-Nukleotide eingebaut, da die TdT zu diesem Zeitpunkt schon größtenteils abgebaut ist (Desiderio *et al.* 1984; Li *et al.* 1993; Bridges 1998). Anschließend werden die leichte und schwere Kette kombiniert. Dadurch erhöht sich die Vielfalt der produzierbaren Immunglobuline weiter. Doch den größten Anteil an der Vielfalt hat die CDR-H3 (Xu *et al.* 2000). Im Weiteren kann es im reifen B-Lymphozyt in den Keimzentren der Lymphfollikel zu Punktmutationen bevorzugt in den CDRs kommen (Betz *et al.* 1993; Besmer *et al.* 2004). Dies nennt man somatische Hypermutation. Zellen, deren Antikörper dabei besonders affin zum jeweiligen Antigen sind, werden hier selektioniert.

Dadurch kommt es zur Affinitätsreifung (Berek *et al.* 1991; Domiati-Saad *et al.* 1998).

### 2.2.3 Immunglobulinklassen

Die variable Region und damit die Antigenspezifität der Immunglobuline einer reifen B-Zelle ist nach Ende der somatischen Rekombination weitgehend festgelegt durch die Auswahl je eines V-, D-, J-Segmentes und das Entfernen der übrigen Segmente. Nur durch die somatische Hypermutation sind noch Veränderungen möglich. Dagegen besitzt der reife, naive B-Lymphozyt noch alle konstanten Regionen und kann damit theoretisch alle Immunglobulinklassen bilden. Die Gensegmente C $\alpha$ , C $\gamma$ , C $\delta$ , C $\epsilon$  und C $\mu$  für die konstante Region der schweren Kette liegen hinter dem JH-Segment. Sie kodieren jeweils für eine Immunglobulinklasse: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Es gibt vier Segmente für C $\gamma$  (1-4) und dementsprechend auch IgG<sub>1</sub> – IgG<sub>4</sub> sowie zwei Segmente für C $\alpha$  mit IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub>. Am 5' Ende jedes Segments findet sich eine regulatorische DNA-Sequenz (Schalterstelle), die eine Rolle beim Klassenwechsel spielt. Am 3' Ende liegt je ein Exon für die membranständige und die sezernierte Form des Immunglobulins (Cooper 1987; Pascual *et al.* 1991). Vor Antigenkontakt werden jedoch nur die C $\mu$ - und C $\delta$ -Gene transkribiert. Der reife, naive B-Lymphozyt exprimiert zunächst gleichzeitig IgM und IgD auf seiner Oberfläche. Für IgM wird das C $\mu$ -Segment alleine transkribiert, für IgD das C $\mu$ - und C $\delta$ -Segment zusammen und dann wird das C $\mu$ -Segment beim Spleißen entfernt (Han *et al.* 2004; Blom *et al.* 2006; Geisberger *et al.* 2006).

Erst nach Antigenkontakt ist ein Klassenwechsel möglich. Dabei wird die variable Region des Immunglobulins durch Ausstülpungen zwischen den Schalterstellen mit einer anderen konstanten Region verbunden. Aus der ausgestülpten DNA entsteht ein zirkuläres Fragment, das dann abgebaut wird (Mainzels 2005). Damit ist die Immunglobulinklasse für den B-Lymphozyten endgültig festgelegt. Er kann sich zur Plasmazelle entwickeln und den entsprechenden Antikörper sezernieren. Durch Zytokine werden die Transkription der konstanten Region und damit das Immunglobulinmuster geändert. Normalerweise ist IgG<sub>2</sub> das häufigste Immunglobulin im Blut. Nach Einfluss von z.B. IL-4 wird in den stimulierten Zellen entweder IgG<sub>4</sub> beim Menschen (IgG<sub>1</sub> bei der Maus) oder IgE gebildet (Jumper *et al.* 1994).

Jede Immunglobulinklasse hat ihre eigene Abwehrfunktion und ihren bevorzugten Wirkungsort. So werden alle Bereiche des Körpers effektiv vor verschiedenen Erregern geschützt (Cooper 1987; Maizels 2005). Als Primärantwort wird zunächst immer IgM sezerniert. Da noch keine somatische Hypermutation stattfand, sind diese ersten Immunglobuline nur niedrig affin. Darum werden sie in großen Mengen sezerniert und bilden Pentamere. Die Pentamere haben zehn Antigenbindungsstellen, was die geringe Affinität weitgehend ausgleicht. Da sie jedoch relativ groß sind, können sie nicht ins Gewebe vordringen. Man findet die IgM-Pentamere daher vor allem im Blut, wo sie Antigene opsonieren und das Komplementsystem aktivieren und so frühzeitig eine Infektion eindämmen (Boes 2000). IgD wird zusammen mit IgM als Rezeptor exprimiert, jedoch selten sezerniert. Darum findet man es nur in sehr geringen Mengen im Blut. Seine Funktion ist unbekannt. Es wird angenommen, dass es eine Rolle während der B-Zell-Selektion spielt (Han *et al.* 2004; Geisberger *et al.* 2006).

Bei IgA, IgE und IgG fand bereits eine Affinitätsreifung statt. Sie liegen als Monomer (IgG, IgE und IgA im Blut) und Dimer (IgA in Sekreten) vor und können besser ins Gewebe diffundieren. IgG findet sich vor allem im Blut. Dort ist es das häufigste Immunglobulin, opsoniert Antigene für Phagozyten und aktiviert das Komplementsystem. IgA findet sich vor allem als Dimer auf Schleimhäuten und in Sekreten an der Körperoberfläche. IgE ist, wie bereits erwähnt, für die Bekämpfung von Parasiteninfektionen wichtig und befindet sich hauptsächlich membrangebunden auf Mastzellen (Cooper 1987; Maizels 2005).

#### **2.2.4 Bindung von klassischen Antigenen und Superantigenen**

Antigene können auf zwei Weisen an der variablen Region eines Antikörpers binden. Die häufigere ist die Bindung an der klassischen Antigenbindungsstelle, die aus den insgesamt 6 CDRs aus schwerer und leichter Kette gebildet wird. Hierbei spielt die CDR-H3-Region die wichtigste Rolle (Padlan *et al.* 1994, MacCallum *et al.* 1996, Xu *et al.* 2000, Collis *et al.* 2003). Das Zentrum der klassischen Antigenbindungsstelle bildet die CDR-H3-Region. Klassische Antigene binden damit nur an B-Zellen, die eine passende CDR-H3-Region besitzen und damit für sie spezifisch sind. Dafür muss in der CDR-H3-Region eine bestimmte AS-Sequenz

mit daraus abgeleiteter passender dreidimensionaler Struktur vorliegen. Durch klassische Antigene werden deshalb nur wenige B-Zellen aktiviert. Diese werden dann im Weiteren zur Proliferation angeregt (Janeway *et al.* 2005). B-Zell-Superantigene dagegen binden nicht an der klassischen Antigenbindungsstelle, sondern an relativ konstanten Regionen der variablen Domäne. Es hat sich gezeigt, dass Superantigene eine Bevorzugung bestimmter  $V_H$ -Familien aufweisen (Pascual *et al.* 1992, Adderson *et al.* 1993, Berberian *et al.* 1993, Ikematsu *et al.* 1993, Newkirk *et al.* 1993, Domiati-Saad *et al.* 1996, reviewed in: Silverman 1992; Marone *et al.* 2006). Hierbei interagieren die Superantigene vor allem mit spezifischen FRs. Diese zeigen innerhalb der variablen Region die größte Konstanz (Xu *et al.* 2000, Collis *et al.* 2003). Die Homologie innerhalb der  $V_H$ -Familien kommt vor allem durch die FRs zustande. So ist zu erklären, dass die Superantigene bestimmte  $V_H$ -Familien bevorzugen. Das *Staphylococcus aureus* Protein A wird z.B. hauptsächlich durch Immunglobuline gebunden, deren  $V_H$ -Segmente zur  $V_{H3}$ -Familie gehören (Sasso *et al.* 1989).

B-Zell-Superantigene binden folglich nicht spezifisch an wenige B-Zellen, sondern an alle, die eine bestimmte  $V_H$ -Familie exprimieren. Da es beim Menschen sieben solcher Familien gibt (Matsuda *et al.* 1998, Cook *et al.* 1995), wird eine größere Anzahl an Zellen gleichzeitig aktiviert. Im Falle der  $V_{H3}$ -Familie, welche die größte ist (Giudicelli *et al.* 2006), würden besonders viele Zellen das Antigen binden, bei den Familien  $V_H 5$  und  $V_H 6$  dagegen weniger. Der durchschnittliche Anteil jeder der 7  $V_H$ -Familien wäre 11% der gesamten B-Zellen, wenn jede  $V_H$ -Familie einen gleich großen Anteil stellte. Da aber die Familien unterschiedlich groß sind, variiert dieser Wert von Familie zu Familie. Damit stimulieren B-Zell-Antigene den entsprechenden Anteil der B-Zellen. Da Superantigene meist Bestandteil häufig vorkommender Krankheitserreger sind, kann vermutet werden, dass sie eine frühe humorale Immunantwort darstellen, die dem angeborenen Immunsystem gleicht (Snow *et al.* 1996, Hofer *et al.* 1999). So kann das Superantigen von einem Teil der Antikörper im Blut sofort gebunden werden und viele B-Zellen werden parallel aktiviert. Würde das Antigen über die klassische Antigenbindungsstelle erkannt, wäre mehr Zeit für die Proliferation der antigenspezifischen Zellen und Produktion der Immunglobuline nötig. Superantigene können daher besonders schnell durch viele Immunglobuline gebunden werden.

Wie bei den anderen Isotypen ist auch bei IgE weit überwiegend die schwere Kette für die Antigen-spezifität verantwortlich (Laffer *et al.* 2001, Edwards *et al.* 2002, Flicker *et al.* 2002). Einige Untersucher fanden in Patienten mit Allergien eine Bevorzugung bestimmter V<sub>H</sub>-Familien im IgE-Molekül und leiteten hieraus die Hypothese ab, dass einige Allergene auch als B-Zell-Superantigene („Superallergen“) wirken könnten (Marone *et al.* 2006). Dies könnte erklären, warum Superallergene beim ersten Antigenkontakt zur allergischen Sofortreaktion führen und eine T<sub>H</sub>2-Reaktion induzieren (Paul *et al.* 1994, Seder *et al.* 1992, Hsieh *et al.* 1992). Es stellt sich folglich für jedes Antigen die Frage, ob es klassischerweise in der CDR-H3-Region bindet oder als Superantigen an einer der V<sub>H</sub>-Familien. Dies ist besonders für Allergene und andere Antigene, die zur Mastzelldegranulation führen, interessant, da hier neue Mechanismen der Mastzelldegranulation entdeckt werden könnten und damit auch neue Therapien für Allergien.

## **2.3 Eingeschränktes Antikörperrepertoire im murinen Modell**

### **2.3.1 Übersicht**

Das Antikörperrepertoire ist von der Fähigkeit abhängig, eine große Vielfalt an Antigenbindungsstellen zu generieren. Da der wichtigste Anteil der Antigenbindungsstelle die CDR-H3-Region ist, ist für ein komplettes Antikörperrepertoire die Vielfalt dieser Region entscheidend. Bei den Immunglobulinen der Vertebraten findet man vorwiegend Intervalle mit neutraler Polarität, die angereichert sind mit hydrophilen Aminosäuren. Hydrophobe Aminosäuren und solche mit großer Ladung sind dagegen selten oder fehlen ganz (Johnson *et al.*, 2000; Ivanov *et al.* 2002). Diese Bevorzugung bestimmter Aminosäuren ist am ehesten durch die Keimbahnevolution des D<sub>H</sub>-Segments zu erklären, welches den Kern der CDR-H3-Region bildet. Dieses Segment enthält in einem von sechs möglichen Leserastern (RF, reading frame) typischerweise die hydrophilen Aminosäuren Tyrosin, Glycin und Serin, die im RF1 enthalten sind. Bei 60% der funktionellen Immunglobuline wird der RF1 benutzt (Ivanov *et al.* 2002). Der RF2 wird dagegen nur bei ca. 20% und der RF3 bei weniger als 5% verwendet. Daraus folgt, dass das Repertoire an CDR-H3 Sequenzen eingeschränkt ist. Bei Abweichungen von dieser Einschränkung kann es zu pathologischen Prozessen wie der Bildung von Antikörper gegen doppelsträngige DNA kommen (Ippolito *et al.* 2003). Um das Antikörperrepertoire einzuschränken, wurde bei Balb/c Mäusen die D<sub>H</sub>-Segment-Vielfalt verändert. Dazu wurde der D<sub>H</sub>-Genlocus in unterschiedlichen Mauslinien durch gene-Targeting auf jeweils ein einzelnes D<sub>H</sub>-Gensegment reduziert, das jeweils in einem anderen Leserahmen platziert wurde (Ippolito *et al.* 2003, Zemlin *et al.* 2008, Schelonka *et al.* 2008).

### **2.3.2 Die $\Delta$ -iD Maus**

In der D-limitierten Maus oder auch  $\Delta$ -iD (Deletion der D-Segmente, stattdessen inverted D) Maus wurde das Zentrum des DFL16.1-Segments durch ein inverses DSP2.2-Segment, iD (inverses D)-Segment genannt, ersetzt. Das DSP2.2-Segment enthält die Aminosäuren Arginin, Asparagin und Histidin. Diese Veränderung führt dazu, dass sich in der CDR-H3-Region nun mehr geladene Aminosäuren als beim

Wildtyp befinden. Dadurch ist das Antikörperrepertoire eingeschränkt. In heterozygoten Mäusen wird das iD-Segment weitaus weniger verwendet als die Wildtypsegmente. Es findet eine Selektion gegen das iD Allel statt (Ippolito *et al.* 2003). In homozygoten Mäusen können dagegen nur iD-Segmente verwendet werden. Dadurch werden durch deren Immunglobuline vorwiegend Antigene erkannt, die an eine CDR-H3-Region mit geladenen Aminosäuren binden.

### **2.3.3 Die $\Delta$ -RF2 Maus**

In der  $\Delta$ -RF2 Maus wurde das DFL16.1-Segment durch eine Leserasterverschiebung zugunsten des RF2 ersetzt (Deletion der D-Segmente, stattdessen RF2). Der RF2 enthält vorwiegend hydrophobe Aminosäuren wie Valin. Analog zur  $\Delta$ -iD Maus befinden sich in der CDR-H3-Region mehr hydrophobe Aminosäuren als beim Wildtyp. Auch bei heterozygoten  $\Delta$ -RF2 Mäusen findet eine Selektion gegen das RF2-Segment statt (Zemlin *et al.* 2008, Schelonka *et al.* 2008). Bei homozygoten Tieren muss das RF2-Segment verwendet werden. Ihre Immunglobuline binden vorwiegend Antigene, die an CDR-H3-Regionen mit hydrophoben Aminosäuren binden.

### **2.3.4 Bedeutung für die Analyse der Bindung von Antigenen an Immunglobulinen**

Die  $\Delta$ -iD- und  $\Delta$ -RF2-Maus haben ein eingeschränktes Antikörperrepertoire im Vergleich zu Wildtyp Balb/c-Mäusen. Die  $\Delta$ -iD Mäuse besitzen in ihrer CDR-H3-Region mehr geladene Aminosäuren (Ippolito *et al.* 2003), die  $\Delta$ -RF2 Mäuse mehr hydrophobe Aminosäuren (Zemlin *et al.* 2008, Schelonka *et al.* 2008). Dadurch sind die Antikörper dieser Mäuse jeweils für unterschiedliche Antigene spezifisch. Wildtyp-Mäuse verwenden bevorzugt ungeladene hydrophile Aminosäuren (Ivanov *et al.* 2002). Antigene, die über die klassische Antigenbindungsstelle erkannt werden, können von einer der drei Mauslinien besser gebunden werden als von den anderen beiden. B-Zell-Superantigene dagegen binden an eine bestimmte V<sub>H</sub>-Familie (Pascual *et al.* 1992, Adderson *et al.* 1993, Berberian *et al.* 1993, Ikematsu *et al.* 1993, Newkirk *et al.* 1993, Domiati-Saad *et al.* 1996, reviewed in: Silverman 1992; Marone *et al.* 2006). Alle drei Mauslinien enthalten die gleichen unveränderten V<sub>H</sub>-Familien. Daher können alle Mauslinien Superantigene gleich

gut binden. Man kann folglich mithilfe des Bindungsverhaltens der Wildtyp,  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 Mäuse Aussagen darüber treffen, ob ein bestimmtes Antigen eher als klassisches oder als Superantigen gebunden wird.



## **2.4 Interleukin-4 introducing Principle of *Schistosoma mansoni* Eggs (IPSE)**

### **2.4.1 Herkunft und Wirkung**

IPSE ist ein homodimeres Glykoprotein, das Bestandteil des löslichen Antigens SmEA (*Schistosoma mansoni* egg Antigen) von Schistosomeneiern ist (Dunne *et al.* 1991; Schramm *et al.* 2003, Schramm *et al.* 2006). Da die Identität von IPSE zunächst unbekannt war, wurde es zunächst als „Principle“ bezeichnet. *Schistosoma mansoni* ist ein Parasit, der zu den Helminthen gehört. Die Infektion erfolgt durch Kontakt zu kontaminiertem Süßwasser. Dabei durchdringen Zerkarien die Haut und infizieren den Wirt. Nach der Infektion kommt es zunächst zu einer moderaten  $T_H1$ -Reaktion, der schnell eine starke  $T_H2$ -Reaktion folgt (Pearce *et al.* 2002). Die  $T_H2$ -Reaktion ist für die Infektionsbekämpfung essenziell. Ist sie gestört, so kommt es zu einer hochpathologischen Infektion (Stadecker *et al.* 2004). Das Fehlen von IL-4 oder dessen Rezeptor IL-4R $\alpha$  auf Makrophagen stört die Infektionsbekämpfung (Brunet *et al.* 1997, Herbert *et al.* 2004). Das Einsetzen der  $T_H2$ -Reaktion erfolgt mit dem Beginn der Eiablage, die in submukösen Darmvenen und in der Leber stattfindet. Bisher ist unklar, welches lymphatische Kompartiment bei der  $T_H2$ -wendigen Immunantwort beteiligt ist und ob sich diese Kompartimente in ihrer Fähigkeit, IPSE-bindende Immunglobuline zu bilden voneinander unterscheiden. In erster Linie kommen die Lymphozyten der Peyer-Plaques, der Milz und des zirkulierenden Blutes mit *Schistosoma mansoni* in Berührung. Erwachsene Würmer dagegen erzeugen eine  $T_H1$ -Reaktion. (Pearce *et al.* 2002). Entscheidend hierfür ist das lösliche Antigen der Eier SmEA (*Schistosoma mansoni* egg Antigen). Mastzellen gesunder, nicht sensibilisierter Nordeuropäer degranulieren nach Exposition mit SmEA und setzen dabei auch IL-4 und IL-13 frei. SmEA führt damit zu einer generellen Aktivierung der Mastzellen (Falcone *et al.* 1996). Dadurch wird die  $T_H2$ -Reaktion begünstigt. Außerdem werden dendritische Zellen durch IL-4 zur Reifung gebracht werden. Dies fördert im Folgenden die Antigenpräsentation (Lutz *et al.* 2000).

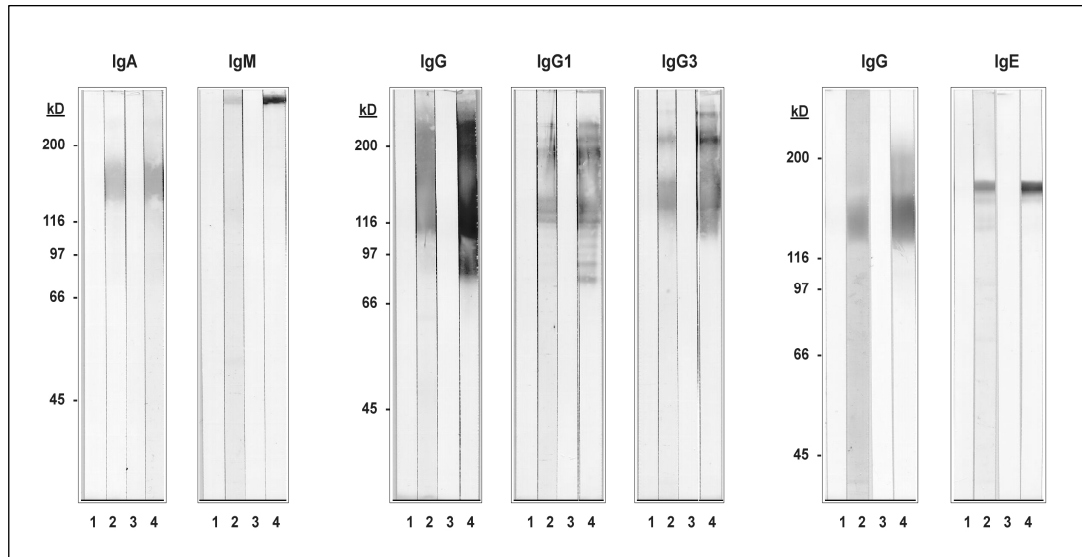
In *E. coli* hergestelltes rekombinantes IPSE und natives IPSE sind in Ihrer Wirkung der Mastzelldegranulation und damit IL-4 Freisetzung in Menschen und Mäusen nicht zu unterscheiden. SmEA ohne IPSE führt nicht zur IL-4 Produktion (Schramm *et al.* 2003). IPSE alleine kann innerhalb von Stunden nach i.v. Injektion

hepatische basophile Granulozyten zur IL-4 Produktion anregen. Es wurde gezeigt, dass das IL-4 nach Erstkontakt mit IPSE ausschließlich aus basophilen Granulozyten und Mastzellen sezerniert wird. T<sub>H</sub>-Zellen sind zu diesem Zeitpunkt nicht an der IL-4-Produktion beteiligt (Schramm *et al.* 2007). Ohne IgE auf den Mastzellen kann SmEA seine Wirkung nicht entfalten (Haisch *et al.* 2001, Falcone *et al.* 1996). IPSE bindet dosisabhängig an IgE (Schramm *et al.* 2003). Basophile Granulozyten von Wildtyp Mäusen sezernieren nach Stimulation mit IPSE IL-4. Basophile Granulozyten von IgE-negativen Mäusen setzen dagegen nach IPSE-Kontakt kein IL-4 frei. Allerdings kann IPSE zusammen mit IL-3 und IL-18 IgE-negative Mastzellen degranulieren. Daraus wird geschlossen, dass IPSE IgE-abhängig aber unter speziellen Umständen auch IgE-unabhängig Mastzellen zur Degranulation bringt (Schramm *et al.* 2007).

#### **2.4.2 Interaktion mit Immunglobulinen, IPSE als alternativer IgE-Ligand (Bedeutung für die allergische Sofortreaktion)**

IPSE bindet an IgE, IgG, IgA und IgM. Dabei ist die Bindung an IgE am stärksten, gefolgt von IgG, IgA und IgM. IPSE kann dabei sowohl am F<sub>ab</sub>- als auch am F<sub>c</sub>-Teil binden (H. Haas *et al.* Forschungszentrum Borstel, unveröffentlicht).

Die Bindung an rezeptorgebundenes IgE und damit die IL-4 Freisetzung kann durch Blockade mit großen Immunglobulinmengen verhindert werden (Schramm *et al.* 2007). Bei der Bindung von IPSE an IgE auf Mastzellen konnten Haas *et al.* zeigen, dass die Bindung ohne Quervernetzung des IgE einhergeht. Hier könnte ein alternativer Weg der Mastzellaktivierung vorliegen, da bisher nur die Aktivierung durch Quervernetzung von IgE bekannt ist. Damit könnten sich auch neue Wege der Mastzellhemmung erschließen. Dafür ist es jedoch zunächst notwendig diese alternative Mastzellaktivierung zu verstehen.



**Abb. 3:** Bindung von IPSE an verschiedene Immunglobulinklassen und –unterklassen bei ca. 120-180 kD im Western blot (S. Blindow, H. Haas, unveröffentlicht).

- 1) Kontrolle (SAVAP);
- 2) biotinyliertes IPSE (+SAVAP);
- 3) Kontrolle (Puffer);
- 4) AP-anti-Immunglobulin-Isotyp

## 2.5 Fragestellung

IPSE bindet an alle Immunglobulin-Isotypen und ist ein potenter Auslöser einer Mastzelldegranulation und damit IL-4 Produktion. Ein wichtiger Mechanismus ist hierbei die Bindung von IPSE an mastzellgebundenes IgE und die Mastzellaktivierung ohne Quervernetzung von IgE. Diese Bindung scheint Antigen-unspezifisch zu sein, da sie schon beim ersten Antigenkontakt eine starke  $T_H2$ -Reaktion auslösen kann, ohne dass vorher spezifisches IgE gebildet wurde. Auch die Bindung an andere Immunglobuline wie IgG ist unspezifisch (Schramm *et al.* 2007). Um zu verstehen, wie IPSE diese alternative Mastzellaktivierung bewirkt, ist es nötig herauszufinden, wo genau IPSE am Immunglobulinmolekül bindet. Mithilfe der Mauslinien mit veränderter CDR-H3-Region lassen sich klassische von Superantigenen unterscheiden. Sollte IPSE als Superantigen an Immunglobuline binden, so wäre kein Unterschied im Bindungsverhalten der verschiedenen Mauslinien zu erwarten. Bisher wurde die IPSE-Bindung an basophile Granulozyten und Mastzellen sowie an lösliche Immunglobuline untersucht. Es liegen noch keine Aussagen vor, ob die IPSE-Bindung in allen lymphatischen Geweben gleich ist.

Dadurch ergibt sich folgende Fragestellung:

1. Können B-Lymphozyten von Mäusen, die noch keinen Kontakt mit *Schistosoma mansoni* hatten, mit ihrem B-Zell-Rezeptor, d.h. mit ihrem membrangebundenen Immunglobulin, IPSE binden?
2. Können IPSE-bindende Immunglobuline im Serum von Mäusen nachgewiesen werden, die noch keinen Kontakt mit *Schistosoma mansoni* hatten?
3. Bindet IPSE als klassisches oder als Superantigen?
  - a. Zeigen sich Unterschiede in der IPSE-Bindung durch die verschiedenen Mauslinien Wt,  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 in der FACS-Analyse?
  - b. Zeigen sich Unterschiede in der IPSE-Bindung durch die verschiedenen Mauslinien Wt,  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 im ELISA?
4. Unterscheiden sich die B-Lymphozyten verschiedener Gewebe in ihrer Fähigkeit, IPSE zu binden?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 FACS (*fluorescence activated cell sorter*)

##### 3.1.1 Geräte, Utensilien, Chemikalien

###### Geräte:

Gerät	Hersteller	Name
FACS-Gerät	BD	FACS-Calibur
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5810 R

###### Utensilien:

Utensil	Hersteller	Bezeichnung	Spezifikation	Cat.No.
Falcon-Röhrchen	Sarstedt	Falcon tube	50 mL, 114x28 mm, PP	62.547.254
Falcon-Röhrchen	Sarstedt	Falcon tube	15 mL, 120x17 mm, PP	62.554.502
96 Well Platte	Nunc	Nunclon delta Surface		163320
FACS-Röhrchen	BD Falcon	Polystyrene Round-Bottom Tube	5mL, 12x75 mm	352052

**Chemikalien:**

Chemikalie	Hersteller	Bezeichnung	Spezifikation	Cat.No.
MACS-Puffer	Miltenyl Biotec	MACS Buffer auto MACS, Running Buffer, MACS Buffer	1500 mL, Bovine Serum Albumin BSA, 0,09% azide, pH 7,2	120-001- 559
Lysis-Puffer		10fach konzentriert	8,02 g NH <sub>4</sub> Cl + 1,01 g KHCO <sub>3</sub> + 0,037 g EDTA auf 100 ml H <sub>2</sub> O	
IPSE- biotinyliert	PD Dr. H. Haas, Borstel	Konzentration 1:10		
Anti-IgM	BD Pharmingen	FITC anti- mouse IgM (II/41)	0,5 mg, 1,0 mL, 0,5 mg/mL	553437
Anti-IgA	BD Pharmingen	FITC anti- mouse IgA (IC10-3)	0,5 mg, 1,0 mL, 0,5 mg/mL	559354
Anti-IgG	BD Pharmingen	FITC rat anti- mouse IgG (A85-1)	0,5 mg, 1,0 mL, 0,5 mg/mL	553443
Anti-IgE	BD Pharmingen	FITC anti- mouse IgE (R35-72)	0,5 mg, 1,0 mL, 0,5 mg/mL	553415
Anti-CD19	BD Pharmingen	PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD19 (1D3)	0,1 mg, 0,5 mL, 0,2 mg/mL	551001
Streptavidin- PE	BD Pharmingen	Streptavidin- PE	0,5mg, 1,0 mL, 0,5 mg/mL	554061
Streptavidin- APC	BD Pharmingen	Streptavidin- APC	0,1mg, 0,5 mL, 0,2 mg/mL	554067

### **3.1.2 Untersuchungsmaterial**

Es wurden untersucht: Peritonealhöhlenzellen (PCL), Milzzellen und Zellen aus den Peyer-Plaques in der FACS-Analyse. Das Untersuchungsmaterial wurde drei verschiedenen Mauslinien entnommen: Balb/c Wildtypmäusen und den beiden in ihrem Antikörperrepertoire veränderten Mauslinien  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -rf2. Die Methodenetablierung wurde anhand von Balb/c Wildtypmäusen vorgenommen. Für die Datenerhebung wurden elf Wildtypmäuse, zehn  $\Delta$ -iD und zehn  $\Delta$ -RF2 Mäuse untersucht. Die Versuchstiere waren zwischen acht und zwölf Wochen alt.. Das Mindestalter war notwendig, damit das Immunsystem entwickelt war und naive B-Zellen in normaler Zahl vorhanden waren. Bei einem Alter der Mäuse über zwölf Wochen treten vermehrt onkologische Erkrankungen des blutbildenden Systems auf, die mit Bildung monoklonaler Antikörper einhergehen können. Für die FACS-Analyse wurden die Tiere nicht immunisiert. Sie wurden antigenarm gehalten.

### **3.1.3 Methoden**

#### **3.1.3.1 Materialgewinnung**

Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet. Im Anschluss wurde die Organentnahme durchgeführt. Nach dem Tod wurden die Tiere mit Nadeln auf der Unterlage fixiert und die Bauchhaut mit Äthanol desinfiziert. Dann wurde die Haut vom parietalen Peritoneum gelöst. Nun erfolgte die Spülung der Peritonealhöhle mit 8 mL MACS-Puffer mithilfe einer 10 mL Spritze. Ca. 6 - 7 mL davon konnten wieder entnommen werden. Die gewonnene Flüssigkeit wurde in einem Falcon-Röhrchen auf Eis zwischengelagert. Als nächstes wurde der Thoraxraum eröffnet und Blut mit einer Spritze aus dem rechten Herzen und der Vena cava inferior gewonnen. Danach wurde die Milz entnommen und der Darm auf Peyer-Plaques untersucht. Die Peyer-Plaques wurden herausgeschnitten, ohne die Darmwand zu perforieren. Milz und Peyer-Plaques wurden in MACS-Puffer gelegt.

### **3.1.3.2 Materialaufbereitung**

Das Blut wurde zentrifugiert und das Serum abpipettiert und tief gefroren (bei -20 °C), um später für den ELISA verwendet zu werden. Die Milz und die Peyer-Plaques wurden jeweils zerkleinert und mit einem Spritzenstempel durch ein 100 µm Sieb in ein 50 mL Falcon-Röhrchen gedrückt. Dabei wurde das Sieb mit 10 mL MACS-Puffer durchgespült. Die Peyer-Plaque-Zellsuspension wurde auf Eis zwischengelagert. 1 mL Lysispuffer wurde mit destilliertem Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Die Milzzellsuspension wurde nun für 5 Minuten bei 1200 rpm und 5°C zentrifugiert und anschließend dekantiert. Der Bodensatz wurde für 3 Minuten mit 3 mL des Lysispuffers bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Minuten wurde die Suspension mit MACS-Puffer auf 30 mL aufgefüllt und so die Lysis beendet. Anschließend wurde wieder für 5 Minuten bei 1200 rpm und 5°C zentrifugiert und dekantiert. Die gewonnenen Zellen wurden dann in 10 mL MACS-Puffer suspendiert und auf Eis gestellt.

### **3.1.3.3 Herstellen einer identischen Zellkonzentration**

In den drei Zellsuspensionen (Peritonealhöhle, Milz, Peyer-Plaques) wurde mittels Zellzähler die Leukozytenkonzentration gemessen. Die absolute Zellzahl jeder Probe wurde berechnet. Anschließend wurden alle Proben auf ein Volumen gebracht, bei dem die Leukozytenkonzentration  $6,7 \times 10^8 / \text{L}$  betrug, da sich bei dieser Konzentration ein ideales Mischungsverhältnis zwischen 150 µl Zellsuspension und den Antikörpern ergab. Nun konnten mit 150 µL jeweils ca. 100000 Zellen entnommen werden, um vergleichbare Färbebedingungen zu erzeugen.

### **3.1.3.4 Herstellen der Verdünnungen**

Die Antikörper und IPSE wurden auf verschiedene Konzentrationen verdünnt.



Antikörper /Antigen	Ursprüng- liche Konzentration	Entnahme volumen	Mit MACS- Puffer auffüllen auf	Verdün- nungs- faktor	Neue Konzentration
IPSE- biotinyliert (IPSE-bio)	130 µg/mL	1,625 µL	325 µL	1:200	$6,5 \times 10^{-4}$ g/L
Anti- mouse CD19 Per CP-Cy5.5	0,2 mg/mL	0,65 µL	325 µL	1:500	$4 \times 10^{-4}$ g/L
Anti- mouse Immunglo- buline FITC	0,5 mg/mL	0,25 µL	100 µL	1:500	$10^{-3}$ g/L
Streptavidi- n-PE	0,5 mg/mL	0,7 µL	350 µL	1:500	$10^{-3}$ g/L
Streptavidi- n-APC	0,2 mg/mL	0,7 µL	350 µL	1:500	$4 \times 10^{-4}$ g/L

### 3.1.3.5 Färbung

#### Aufbringen der Zellen auf die 96-well Platte

Es wurden jeweils 150 µL, also ca. 100000 Zellen aus der Zellsuspension entnommen und nach folgendem Schema auf die Platte pipettiert:

	1	2	3	4	5	6
A	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz
B	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz
C	PCL		PCL	PCL	PCL	PCL
D	Peyer- Plaques		Peyer- Plaques	Peyer- Plaques	Peyer- Plaques	Peyer- Plaques

Dann wurde die Platte bei 1200 rpm und 5°C für 5 Minuten zentrifugiert und dann dekantiert. Die Zellen am Boden der Wells wurden nun gefärbt.

### **Inkubation mit IPSE-bio**

Zunächst wurde mit IPSE inkubiert und dann gewaschen. So sollte verhindert werden, dass IPSE an das Anti-CD19 und das Anti-IgM bindet. Anti-CD19 und Anti-IgM sind Rattenantikörper. Da IPSE sowohl an murine als auch an humane Antikörper bindet, war zu erwarten, dass auch eine Bindung an die Rattenantikörper stattfindet. Wäre gleichzeitig mit IPSE, Anti-CD19 und Anti-IgM inkubiert worden, so hätte eine zusätzliche IPSE-Bindung durch Anti-CD19 und Anti-IgM zu einem zu hohen Anteil IPSE-bindender Zellen in der FACS-Analyse geführt. Darum sollte nach dem Waschen nur IPSE vorhanden sein, das an die Mausantikörper gebunden hat. Es wurden jeweils 20 µL des verdünnten IPSE-bio in folgende Wells IPSE gegeben:

	1	2	3	4	5	6
A Milz						
B Milz		IPSE	IPSE	IPSE	IPSE	IPSE
C PCL			IPSE	IPSE	IPSE	IPSE
D Peyer-Plaques			IPSE	IPSE	IPSE	IPSE

Die Zellen wurden 25 Minuten mit IPSE-bio auf Eis inkubiert. Nach 10 bis 15 Minuten wurde 2-3-mal vorsichtig auf- und abpipettiert. Nach der Inkubation wurde mit 180 µL MACS-Puffer gewaschen durch Auf- und Abpipettieren. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm und 5°C für 5 Minuten zentrifugiert und dann dekantiert.

### **Inkubation mit Sekundärantikörpern, Anti-Immunglobulinen und Anti-CD19**

Im nächsten Schritt wurden jeweils 20 µL der Sekundärantikörper SA-PE (bzw. SA-APC), Anti-Immunglobuline und Anti-CD19 in die jeweiligen Wells gegeben. Die Verteilung sieht man an folgendem Schema.

	1	2	3	4	5	6
A Milz	Zellen	AntiCD1 9	Anti-IgM	Anti-IgG	Anti-IgA	Anti-IgE
B Milz	SA-PE	IPSE-bio + SA-PE	AntiCD1 9+Anti- IgM +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgG +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgA +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgE +IPSE- bio +SA- PE
C PCL	Zellen		AntiCD1 9+Anti- IgM +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgG +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgA +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgE +IPSE- bio +SA- PE
D Peyer- Plaques	Zellen		AntiCD1 9+Anti- IgM +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgG +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgA +IPSE- bio +SA- PE	AntiCD1 9+Anti- IgE +IPSE- bio +SA- PE

Die Wells A2 – A6 und B1 – B2 entsprechen den Einzelstainings. A1, C1 und D1 sind ungefärbte Zellen. Nun wurden die Zellen für 25 Minuten auf Eis und unter Lichtabschluss mit den Antikörpern inkubiert. Nach 10 -15 Minuten wurde wieder auf- und abpipettiert. Nach den 25 Minuten wurde mit 180 µL MACS-Puffer gewaschen und anschließend bei 1200 rpm und 5°C für 5 Minuten zentrifugiert. Dann wurde dekantiert.

### Messung

Die Zellen wurden in 150 µL MACS-Puffer resuspendiert und auf Eis zum FACS-Gerät gebracht. Dort erfolgte die Messung am FACS Calibur der Firma BD. Die

Auswertung der Rohdaten erfolgte dann mithilfe des Programms WinMDI. Hierbei wurden zunächst der SSC gegen CD19 aufgetragen. In dieser Darstellung wurde dann ein gate für die CD19 positiven Zellen gelegt. Dann wurde die Ansicht von FSC und SSC durch das CD19 gate gewählt. Hier wurde dann ein Lymphozytengate gelegt. Anschließend wurden gegeneinander aufgetragen: CD19 gegen IgM (CD19/IgA, CD19/IgE, CD19/IgG), CD19 gegen IPSE und IgM gegen IPSE (IgA/IPSE, IgE/IPSE, IgG/IPSE).

## 3.2 ELISA

### 3.2.1 Geräte, Utensilien, Chemikalien

#### Chemikalien:

Chemikalie	Hersteller	Cat.No.
PBS	PAA	
BSA	Sigma	A-3059
Tween20	Merck	8221840500
Ovalbumin Grad IV	Sigma	A-2512
IPSE		
biotinyliertes anti-murines-IgM	BD	553406
biotinyliertes anti-murines-IgG <sub>1</sub>	BD	553441
Streptavidin-Peroxidase	Calbiochem	189733
POD-Substrat BM blue	Roche	1484281
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck	

#### Utensilien:

Utensil	Hersteller	Bezeichnung	Cat.No.
96 well Platte	Nunc	Nunc MaxiSorp	Nunc 442404

### 3.2.2 Untersuchungsmaterial

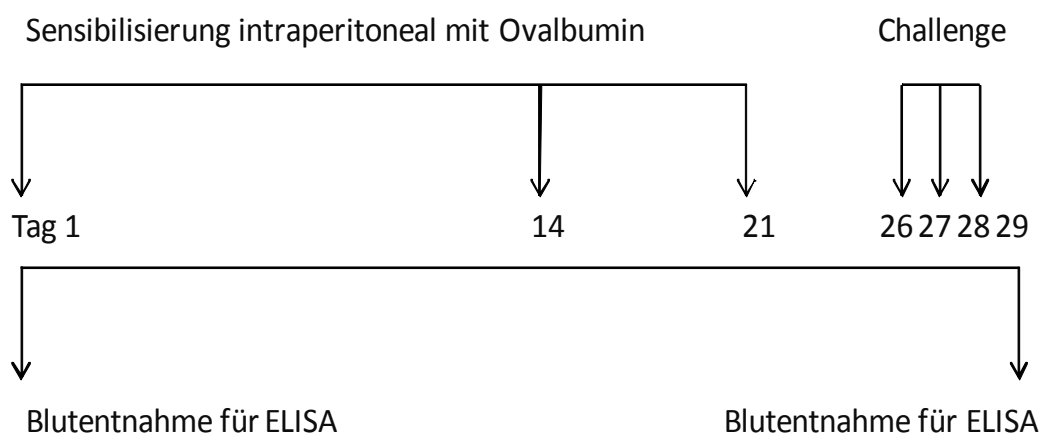
Es wurde Serum der verschiedenen Mauslinien im ELISA untersucht. Das Untersuchungsmaterial wurde drei verschiedenen Mauslinien entnommen: Balb/c Wildtypmäusen und den beiden in ihrem Antikörperrepertoire veränderten Mauslinien  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -rf2. Für die Datenerhebung wurden zehn Wildtypmäuse, zehn  $\Delta$ -iD und zehn  $\Delta$ -rf2 Mäuse untersucht. Die Versuchstiere waren im Alter zwischen acht und zwölf Wochen, damit ihr Immunsystem entwickelt war, aber sie noch keine onkologischen Erkrankungen des blutbildenden Systems aufwiesen. Es wurden Mäuse nach zwei unterschiedlichen Protokollen sensibilisiert und dann

untersucht. Nach Protokoll 1 wurden die Mäuse zunächst nicht immunisiert. Nach der ersten Untersuchung wurden sie mit Ovalbumin sensibilisiert und dann ihr Serum erneut untersucht. In dieses Protokoll wurden 15 Tiere eingeschlossen. In Protokoll 2 wurden 36 Tiere eingeschlossen und in zwei Gruppen aufgeteilt. 13 Mäusen wurde PBS intraperitoneal injiziert, 23 Mäusen wurde Ovalbumin injiziert.

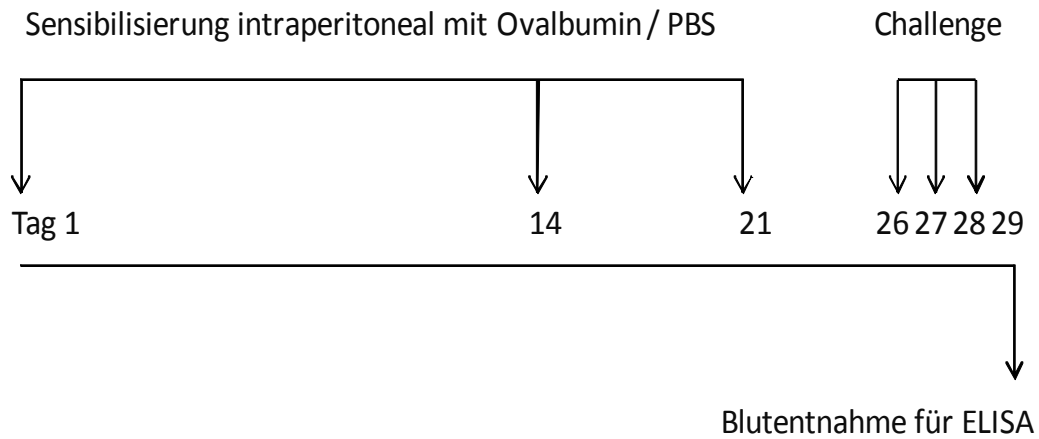
### 3.2.3 Methoden

#### 3.2.3.1 Materialgewinnung und Sensibilisierung

Um höhere Immunglobulinspiegel zu erzeugen, wurde ein Teil der Mäuse (s. 3.2.2) mit Ovalbumin sensibilisiert. Im Versuchsprotokoll 1 wurde den Tieren zunächst Blut aus der unteren Schwanzvene entnommen. Dieses diente als Negativkontrolle. Dann erfolgte die intraperitoneale Sensibilisierung an den Tagen 1, 14, 21 mit 200  $\mu$ L Ovalbumin Grad IV (50  $\mu$ g/mL) plus ImjectAlum (7,5 mg/mL). An den Tagen 26, 27, 28 erfolgte die inhalative Provokation mit Ovalbumin Grad V (1% Lösung) für 20 Minuten in der Verneblerkammer. Am Tag 29 wurde dann erneut Blut aus der Schwanzvene entnommen. Im Versuchsprotokoll 2 (Negativkontrolle) wurde im gleichen zeitlichen Ablauf den Mäusen nur das Adjuvans ImjectAlum (7,5 mg/mL) ohne Ovalbumin appliziert. Die anschließende inhalative Ovalbumingabe erfolgte entsprechend Protokoll 1.



**Abb. 4:** Sensibilisierung nach Protokoll 1



**Abb. 5:** Sensibilisierung nach Protokoll 2

### 3.2.3.2 Herstellen der Antikörperverdünnungen und Pufferlösungen

Puffer	Menge	Verdünnen	Procedere
Coating-Buffer: 0.1 M NaHCO <sub>3</sub>	8.4 g	In 1 L Aqua dest.	pH 9,5
Verdünnungslösung für Proben: 3% BSA in PBS	3 g BSA	in 100 ml PBS	Lagern bei -20 °C
Waschpuffer: PBS-0.05% Tween	0.5 ml Tween20	ad 1.000 ml PBS	Bis zu 3 Tagen bei + 4°C

Antikörper	Ursprüngliche Konzentration	Entnahme volumen	Mit PBS/3%BS A auffüllen auf	Verdünnungsfaktor	Neue Konzentration
IPSE	130 $\mu\text{g/mL}$	185 $\mu\text{L}$	12 mL	1:65	2 $\mu\text{g/mL}$
Mausnormalserum für Standardreihe IgM				1:20 – 1:20.480	
Mausnormalserum für Standardreihe IgG <sub>1</sub>				1:50 – 1:51.200	
Serumprobe für IgM				1:100	
Serumprobe für IgG <sub>1</sub>				1:1000	
biotinyliertes anti-murines-IgM / IgG <sub>1</sub>				1:200	
Streptavidin-Peroxidase				1:10.000	

### 3.2.3.3 Coating

Am ersten Tag wurde die 96 Well-Platte direkt beschichtet. Hierfür wurde IPSE zunächst verdünnt auf eine Konzentration von 2  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Hierfür mussten 185  $\mu\text{L}$  IPSE mit 12 ml PBS – Puffer aufgefüllt werden. Danach wurde in jedes well 100  $\mu\text{L}$  des verdünnten IPSE gegeben. Das Ganze wurde über Nacht bei 4° C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Wells zunächst 3 - 4-mal mit PBS-Tween gewaschen.





### **3.2.3.5 Aufbringen der Sekundär- und Tertiärantikörper**

Am dritten Tag wurden die Wells fünfmal mit PBS-Tween gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper, biotinyliertes anti-murines Immunglobulin, aufgebracht. Je nachdem, ob IgM oder IgG<sub>1</sub> nachgewiesen werden sollte, wurde anti-IgM oder anti-IgG<sub>1</sub> in separaten Versuchen aufgetragen. Hierfür wurden von der Verdünnungslösung (anti-Ig 1:200, 60 µL auf 12 mL 12 ml PBS / 3% BSA) jeweils 100 µL in jedes well gegeben. Dann wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine fünfmalige Waschung mit PBS-Tween. Daraufhin wurde der Tertiärantikörper, Streptavidin-Peroxidase, in Verdünnung 1:10000 (in PBS / 3% BSA) hinzugegeben. Dann erfolgte die Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde siebenmal mit PBS-Tween gewaschen.

### **3.2.3.6 Entwickeln, Stoppen und Messen**

Als nächstes wurde je 100 µl POD-Substrat BM blue zum Entwickeln auf jedes Well gegeben und das ganze für 5 – 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sobald ein Unterschied zwischen niedrigstem Standard und Leerwert erkennbar war, wurde die Reaktion gestoppt. Hierfür wurden auf jedes well 50 µL Schwefelsäure gegeben. Dann erfolgte die Messung der Adsorption innerhalb von 30 Minuten am Photometer bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 570 nm. Die Konzentrationen der Serumproben wurden computergestützt anhand mitgeführter Standardkurven ermittelt.

### **3.2.3.7 Bestimmung des Gesamtgehalts an Immunglobulinen**

Zunächst wurde der Primärantikörper (anti-Maus IgM, 0.5 mg/ml, [BD 553435]) bzw. (anti-Maus IgG<sub>1</sub>, 0.5 mg/ml, [BD 553445]) 1:250 in Coating-Buffer verdünnt [Zielkonzentration ist 2 µg/ml]. Davon wurden je 100 µl in jedes Well der Platte pipettiert und das Ganze bei +4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit PBS-Tween 3 - 4 mal gewaschen und mit 150 µL PBS / 3% BSA pro Well geblockt. Es folgten 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur. Als nächstes wurden die Standardreihen aufgetragen. Der IgM Standard lag in der Konzentration

500 µg/mL vor und wurde um den Faktor 1:1.000 auf die Zielkonzentration 500 ng/mL mit PBS / 3% BSA verdünnt. Der IgG<sub>1</sub> Standard lag ebenfalls als 500 µg/mL und wurde um den Faktor 1:2.000 auf 250 ng/mL verdünnt. Danach wurden die Verdünnungsreihen hergestellt. In das erste Röhrchen wurde 900 µL der 500 ng/mL IgM (bzw. 400 µL der 250 ng/mL IgG<sub>1</sub>) Lösung gegeben, in alle folgenden Röhrchen 300 µL des PBS / 3% BSA. Es wurden jeweils 300 µL aus dem Röhrchen genommen und mit dem nächsten Röhrchen vermischt. So ergaben sich folgende Verdünnungsreihen: IgM: 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 etc. ng/mL. IgG<sub>1</sub>: 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 etc. ng/mL

Die Standardreihen wurden in den beiden ersten Reihen der Elisa-Platte (Doppelbestimmung) auftragen (100 µl pro Well); die Felder 11 und 12 wurden nur mit Verdünnungslösung beschickt (Blank/Leerwert).

Die Serumproben wurden verdünnt (nicht-immunisierte Tiere 1:10; immunisierte Mäuse 1:10.000/1:100.000) und je 100 µl pro Well auftragen, davon pro Tier jeweils zwei identische Wells für Doppelbestimmung. Dann erfolgte die Inkubation über Nacht bei +4°C. Am dritten Tag wurde fünfmal mit PBS-Tween gewaschen. Dann erfolgte das Markieren mit dem zweiten Antikörper, biotinyliertes anti-murines IgM 1:200 (bzw. IgG<sub>1</sub>). Davon wurden in jedes Well 100 µL gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde gewaschen. Als nächstes wurden je 100 µL des dritten Antikörpers Streptavidin-Peroxidasekonjugat in der Verdünnung 1 : 10.000 in jedes Well gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurde wiederum gewaschen. Es wurde mit je 100 µL POD-Substrat BM blue pro Well entwickelt. Hierfür wurde 7 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, sobald zwischen niedrigstem Standard und Leerwert ein Unterschied zu erkennen war. Hierzu wurden 50 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jedes Well gegeben.

Die Messung erfolgte maximal innerhalb 30 Minuten am Photometer bei 450 nm gegen 570 nm. Bei der Auswertung wurde die optische Dichte der IPSE-bindenden Immunglobuline in Beziehung gesetzt zum Gesamtgehalt an Immunglobulinen. Die Methode wurde durch Herrn Dr. Sebastian Kerzel und Herrn Dr. Helmut Haas in Borstel entwickelt.

## 4. Ergebnisse

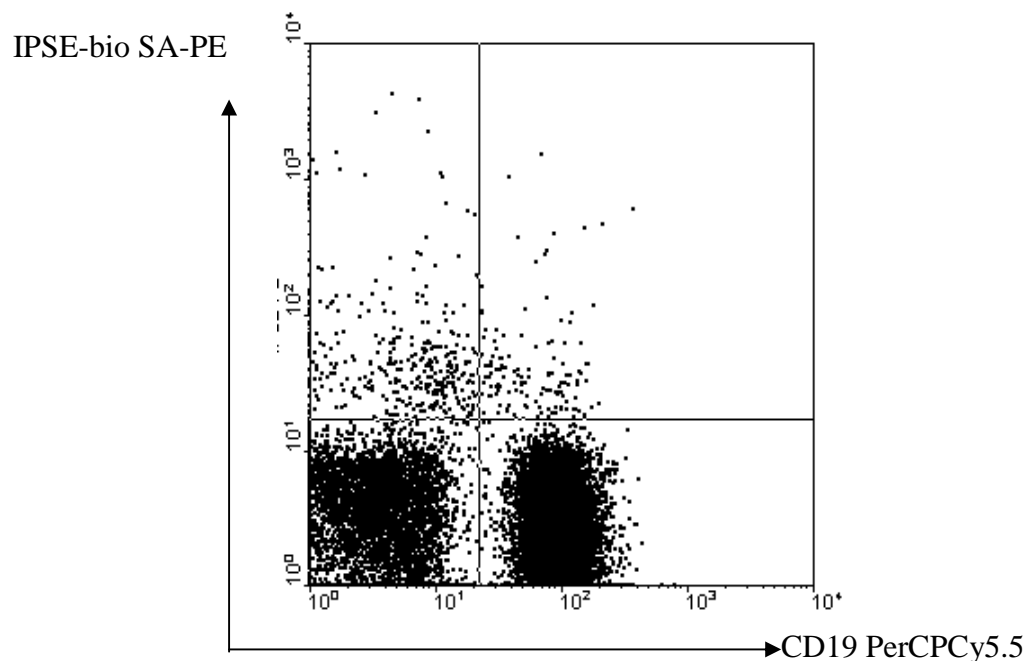
### 4.1 FACS

#### 4.1.1 Übersicht

In der FACS-Analyse zeigten zahlreiche Zellen eine IPSE-Bindung. Ein Teil der IPSE-bindenden Zellen war zugleich CD19 positiv und konnte somit als B-Zellen identifiziert werden. Die übrigen IPSE-bindenden Zelltypen befanden sich wie erwartet im Forward/Sideward Scatter in der Region der Monozyten, Mastzellen und Makrophagen sowie des Zelldetritus und wurden hier nicht weiter analysiert. Für die CD19 und IgM-positiven Zellen ließ sich eindeutig eine IPSE-Bindung nachweisen, die quantifiziert werden konnte. Auch für die IgA, IgE und IgG positiven Zellen zeigte sich qualitativ eine IPSE-Bindung. Aufgrund der erwartungsgemäß sehr geringen Anzahl IgG-, IgA- und IgE-positiver Zellen war eine Quantifizierung der IPSE-bindender Zellen mittels FACS Analyse in diesen Zellpopulationen nicht möglich.

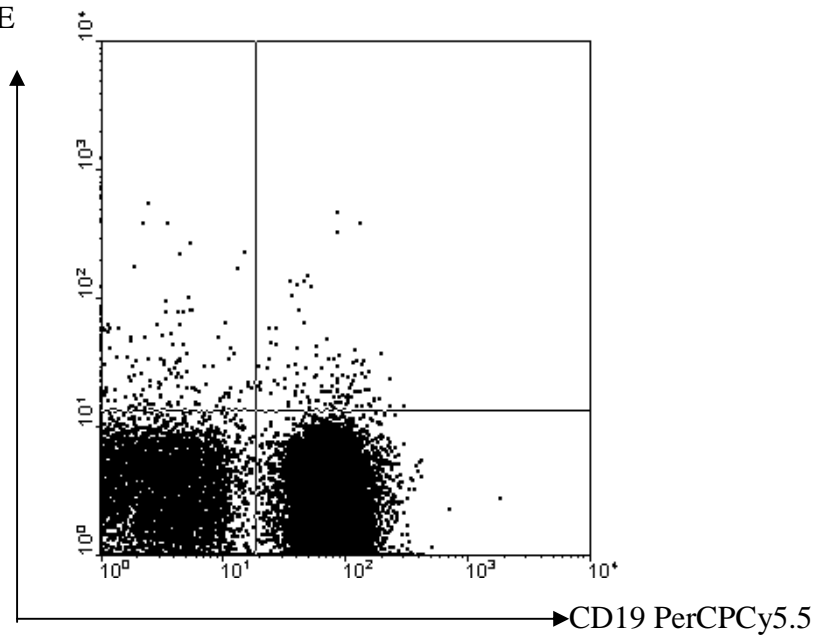
Exemplarische FACS-Analyse am Beispiel der Peyer-Plaques zeigt die Abbildung 6.

Wildtyp:

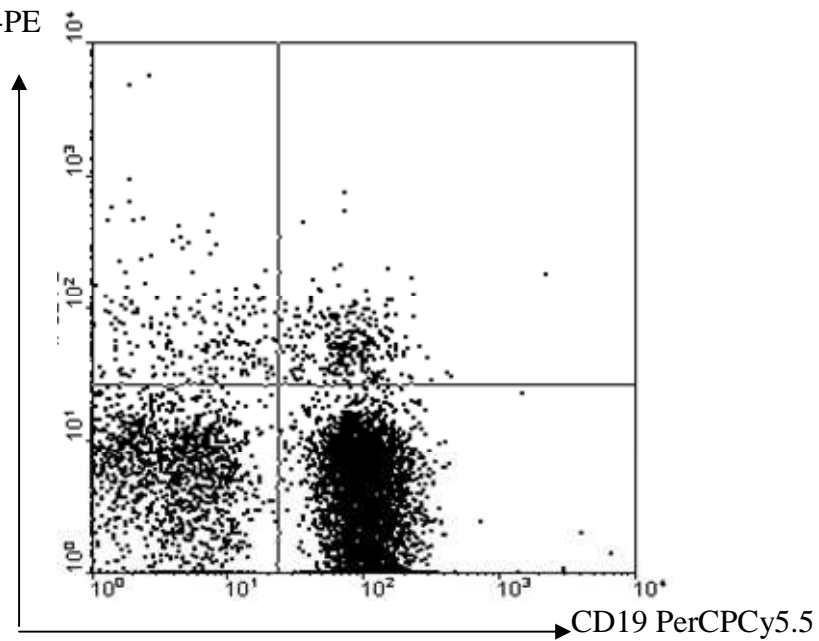


$\Delta$ -iD:

IPSE-bio SA-PE

 $\Delta$ -RF2:

IPSE-bio SA-PE



**Abb. 6:** Exemplarische FACS-Analyse am Beispiel der Peyer-Plaques

Eine IPSE-Bindung zeigte sich bei allen Mauslinien und allen untersuchten Geweben. Die Einzelwerte für die Mauslinien und Gewebe der CD19 und IgM positiven Zellen finden sich in Tabelle Punkt 7.1 im Anhang. Da die Werte normalverteilt waren, wurden zur grafischen Darstellung der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Außerdem wurde zur Signifikanzberechnung der T-Test durchgeführt.

#### 4.1.2 Verschiedene Gewebe

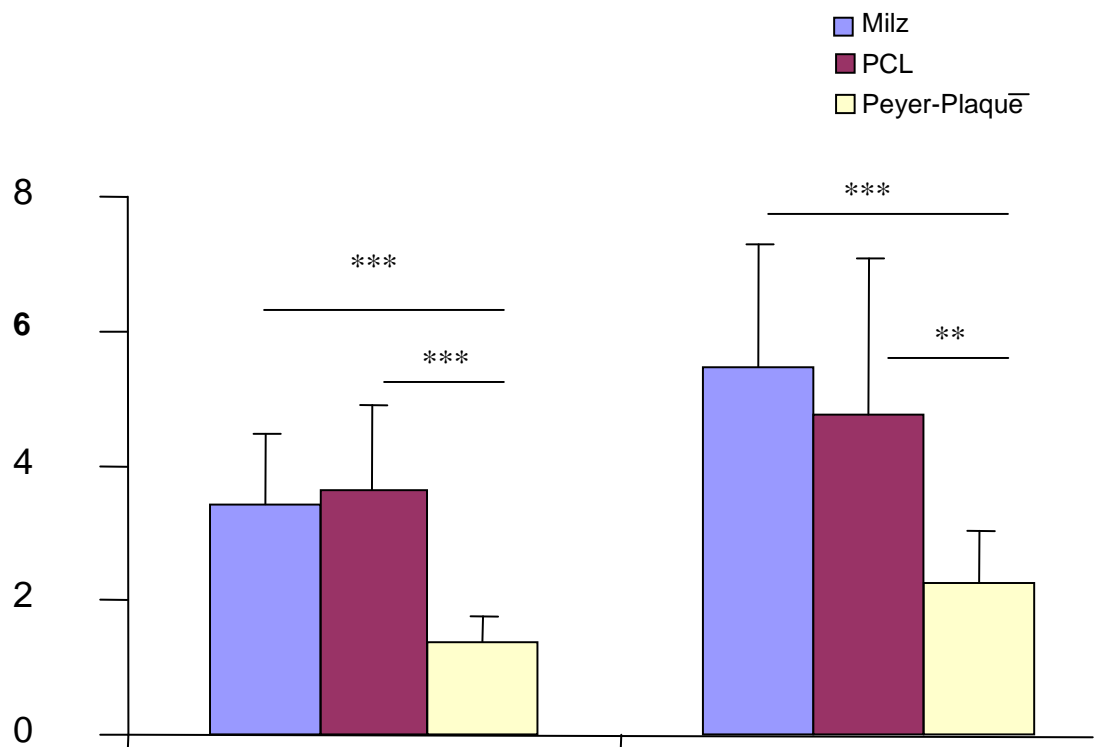
In allen drei Geweben waren die Zellen in der Lage, IPSE zu binden. Allerdings waren im Durchschnitt nur ca. 2 – 5 % der CD19 und IgM positiven Zellen fähig, IPSE zu binden.

##### 4.1.2.1 Wildtypmäuse

Es wurden elf Wildtypmäuse untersucht. Die PCL einer Maus konnte aus technischen Gründen nicht verwendet werden. Die Tabelle 1 zeigt den Mittelwert des Anteils IPSE-bindender Zellen in verschiedenen Geweben der Wildtypmäuse.

**Tab. 1:** Anteil IPSE-bindender Zellen bei Wildtypmäusen

Gewebe	Anteil IPSE positiver an CD19 positiven Zellen	Anteil IPSE positiver an CD19 und IgM positiven Zellen
Milz	3,4 %	5,4 %
PCL	3,6 %	4,8 %
Peyer-Plaques	1,4 %	2,3 %



**Abb. 7:** Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent für Wildtypmäuse, Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet:

$p < 0.05 \rightarrow *$  ;  $p < 0.01 \rightarrow **$  ;  $p < 0.001 \rightarrow ***$

In Abbildung 7 sieht man, dass in der Milz und in Peritonealzellen ein größerer Teil der CD19 positiven und CD19 und IgM positiven Zellen IPSE bindet als in den Peyer-Plaques. Beim Vergleich von Milz mit Peyer-Plaques ergibt für die CD19 positiven und IgM positiven Zellen ein signifikanter Unterschied für ein Signifikanzniveau von  $< 0,01$ . Auch beim Vergleich von PCL mit Peyer-Plaques ergibt sich ein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse des Signifikanztests zeigt Tabelle 2:

**Tab. 2:** T-Test für den Vergleich der IPSE-Bindung verschiedener Gewebe der Wildtypmäuse

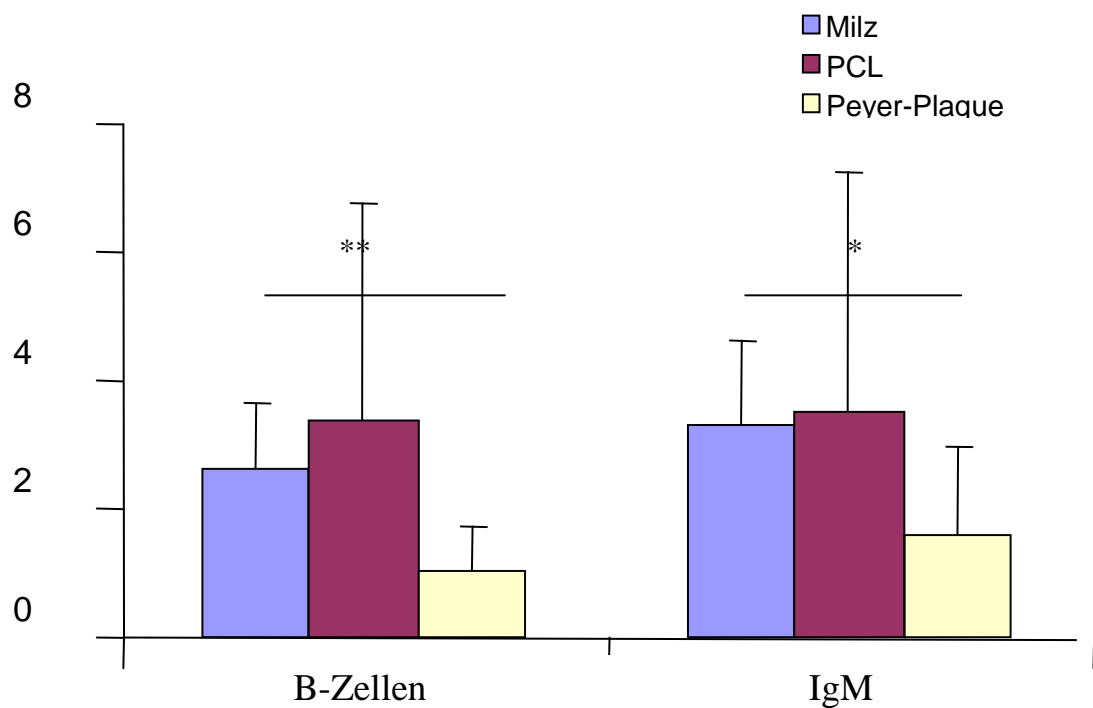
Wildtyp	CD19 positiv	CD19 + IgM positiv
Milz / PCL	0,68 (nicht signifikant)	0,48 (nicht signifikant)
Milz / Peyer-Plaques	$3 \times 10^{-5}$	$10^{-4}$
PCL / Peyer-Plaques	$7 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-3}$

#### 4.1.2.2 $\Delta$ -iD Mäuse

Bei den  $\Delta$ -iD Mäusen wurden zehn Tiere untersucht. Hier konnten die Daten einer Maus jedoch nicht erhoben werden, so dass die Fallzahl neun beträgt. Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte des Anteils IPSE-bindender Zellen in verschiedenen Geweben der  $\Delta$ -iD Mäuse.

**Tab. 3:** Anteil IPSE-bindender Zellen bei  $\Delta$ -iD Mäusen

Gewebe	Anteil IPSE positiver an CD19 positiven	Anteil IPSE positiver an CD19 und IgM positiven
Milz	2,6 %	3,3 %
PCL	3,4 %	3,5 %
Peyer-Plaques	1,0 %	1,6 %



**Abb. 8:** Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent für  $\Delta$ -iD Mäuse, Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet:

pY0.05 → \* ; P<0.01 → \*\* ; P<0.001 → \*\*\*



In Abbildung 8 sieht man, dass in der Milz und Peritonealzellen ein größerer Teil der C19 positiven und CD19 und IgM positiven Zellen IPSE bindet als in den Peyer-Plaques. Beim Vergleich von Milz mit Peyer-Plaques ergibt für die CD19 positiven und IgM positiven Zellen ein signifikanter Unterschied. Beim Vergleich von PCL mit Peyer-Plaques ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Dies kann jedoch auch auf die große Varianz der PCL-Werte zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse des Signifikanztests zeigt Tabelle 4.

**Tab. 4:** T-Test für den Vergleich der IPSE-Bindung verschiedener Gewebe der  $\Delta$ -iD Mäuse

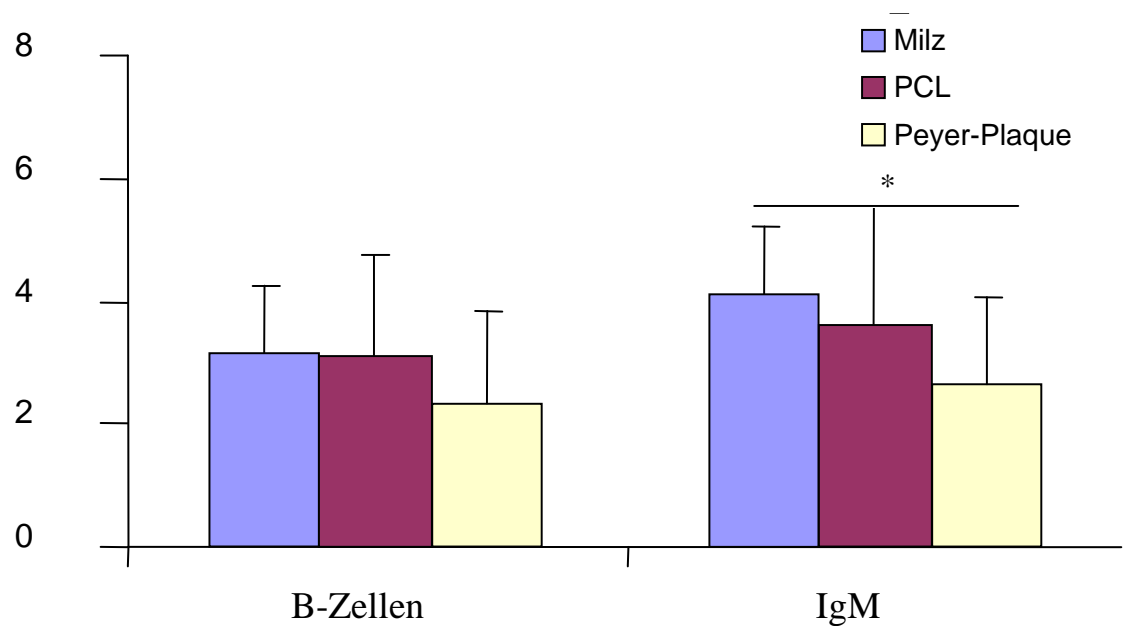
$\Delta$ -iD	CD19 positiv	CD19 + IgM positiv
Milz / PCL	0,53	0,88
Milz / Peyer-Plaques	<b>0,002</b>	<b>0,02</b>
PCL / Peyer-Plaques	0,06	0,19

#### 4.1.2.3 $\Delta$ -RF2 Mäuse

Bei den  $\Delta$ -RF2 Mäusen wurden zehn Tiere untersucht. Tabelle 5 zeigt den Mittelwert des Anteils IPSE-bindender Zellen in verschiedenen Geweben der  $\Delta$ -RF2 Mäuse.

**Tab. 5:** Anteil IPSE-bindender Zellen bei  $\Delta$ -RF2 Mäusen

Gewebe	Anteil IPSE positiver an CD19 positiven	Anteil IPSE positiver an CD19 und IgM positiven
Milz	3,1 %	4,1 %
PCL	3,1 %	3,6 %
Peyer-Plaques	2,3 %	2,6



**Abb. 9:** Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent für  $\Delta$ -RF2 Mäuse, Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet:

$p < 0.05 \rightarrow *$ ;  $p < 0.01 \rightarrow **$ ;  $p < 0.001 \rightarrow ***$

In Abbildung 9 sieht man, dass die CD19 und IgM positiven Zellen aller Gewebe in nahezu gleichem Maß IPSE binden können. Für den Vergleich Milz mit Peyer-Plaques ergibt sich für IgM positive Zellen ein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse des Signifikanztests zeigt Tabelle 6.

**Tab. 6:** T-Test für den Vergleich der IPSE-Bindung verschiedener Gewebe der  $\Delta$ -RF2 Mäuse

$\Delta$ -RF2	CD19 positiv	CD19 + IgM positiv
Milz / PCL	0,95	0,53
Milz / Peyer-Plaques	0,22	<b>0,03</b>
PCL / Peyer-Plaques	0,32	0,28

Als Zusammenfassung aller drei Mauslinien lässt sich sagen, dass die Zellen der Milz und PCL eine höhere IPSE-Bindung aufweisen als die Zellen der Peyer-Plaques. Allerdings ergibt sich im T-Test nur für die Wildtypiere ein eindeutig signifikanter Unterschied für alle Vergleiche mit den Peyer-Plaques. Für  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 Mäuse ist der Unterschied zwar optisch erkennbar doch nicht immer signifikant.

#### 4.1.3 Verschiedene Mauslinien

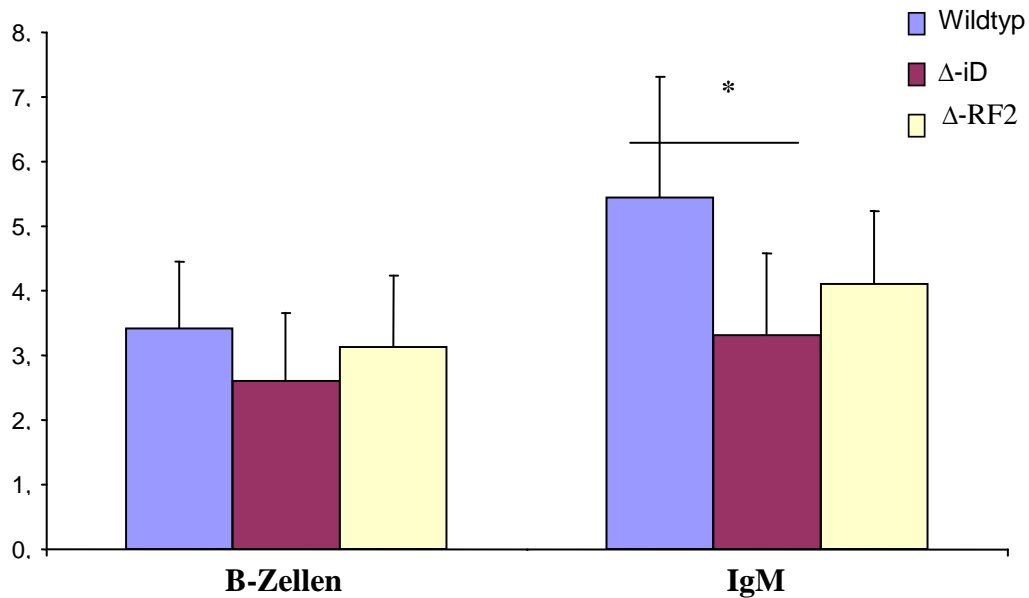
Alle drei Mauslinien waren in der Lage, IPSE zu binden. Allerdings waren im Durchschnitt nur ca. 2 – 5 % der CD19 und IgM positiven Zellen fähig, IPSE zu binden.

##### 4.1.3.1 Milz

Tabelle 7 zeigt den Mittelwert des Anteils IPSE-bindender Zellen in der Milz der verschiedenen Mauslinien.

**Tab. 7:** Anteil IPSE-bindender Zellen in der Milz

Milz	Anteil IPSE positiver an CD19 positiven	Anteil IPSE positiver an CD19 und IgM positiven
Wildtyp	3,1 %	4,1 %
$\Delta$ -iD	2,6 %	3,3 %
$\Delta$ -RF2	3,1 %	4,1 %



**Abb. 10:** Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent für die Milz, Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet:

$p > 0.05 \rightarrow *$ ;  $P < 0.01 \rightarrow **$ ;  $P < 0.001 \rightarrow ***$

In Abbildung 10 erkennt man, dass der Anteil IPSE-bindender Zellen in der Milz für alle drei Mauslinien ähnlich groß ist. Für die IgM positiven Zellen ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und  $\Delta$ -iD.

Die Ergebnisse des Signifikanztests sieht man in Tabelle 8.

**Tab. 8:** T-Test für den Vergleich der IPSE-Bindung verschiedener Mauslinien für Milzlymphozyten

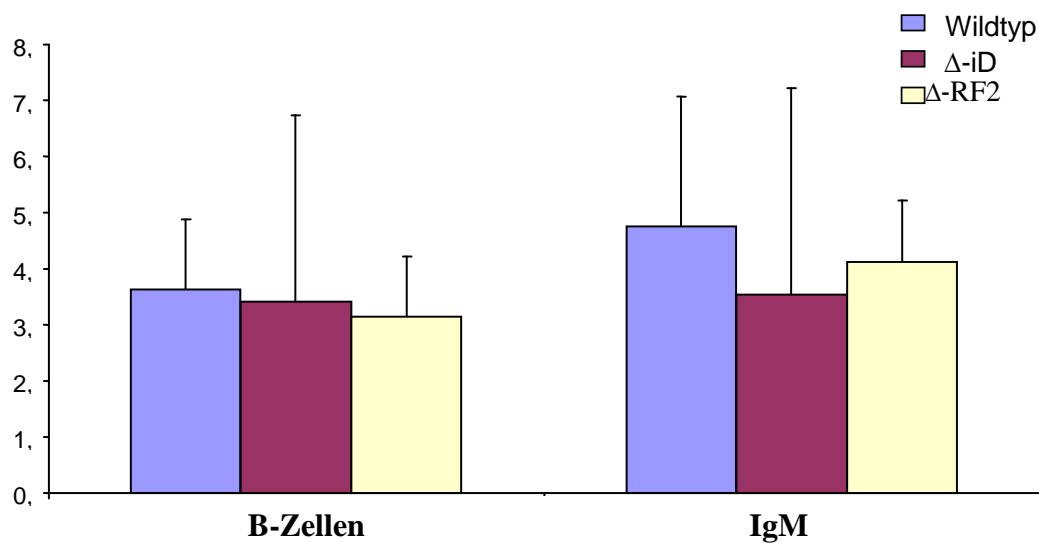
Milz	CD19 positiv	CD19 + IgM positiv
Wildtyp / $\Delta$ -iD	0,12	<b>0,012</b>
Wildtyp / $\Delta$ -RF2	0,59	0,08
$\Delta$ -iD / $\Delta$ -RF2	0,32	0,19

#### 4.1.3.2 PCL

Tabelle 9 zeigt den Mittelwert des Anteils IPSE-bindender Zellen der PCL der verschiedenen Mauslinien.

**Tab. 9:** Anteil IPSE-bindender Zellen der PCL

PCL	Anteil IPSE positiver an CD19 positiven	Anteil IPSE positiver an CD19 und IgM positiven
Wildtyp	3,6 %	4,8 %
$\Delta$ -iD	3,4 %	3,5 %
$\Delta$ -RF2	3,1 %	3,6 %



**Abb. 11:** Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent für PCL, Mittelwerte und Standardabweichung.

Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet:

$p > 0.05 \rightarrow *$  ;  $P < 0.01 \rightarrow **$  ;  $P < 0.001 \rightarrow ***$

Für die PCL ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Mauslinien.

Die Ergebnisse des Signifikanztests sieht man in Tabelle 10.

**Tab. 10:** T-Test für den Vergleich der IPSE-Bindung verschiedener Mauslinien für PCL

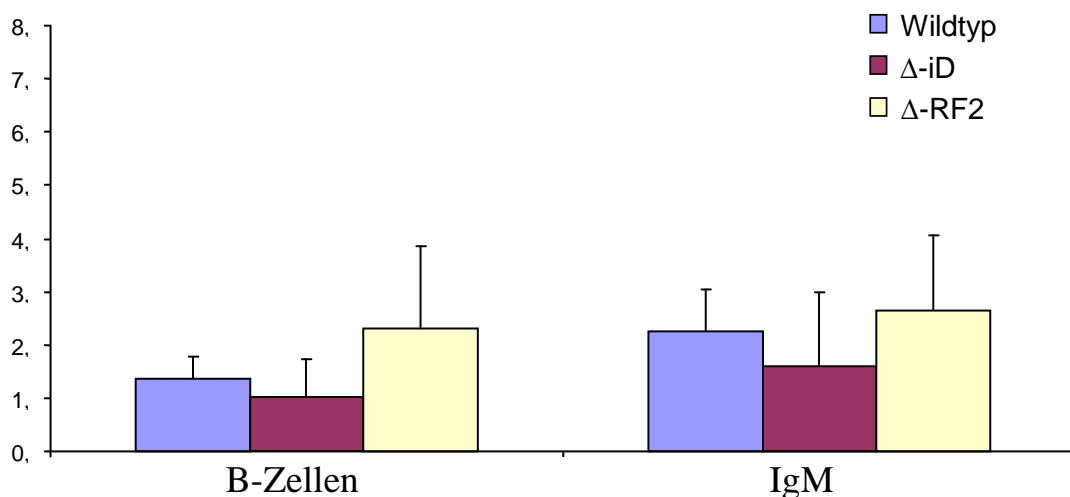
PCL	CD19 positiv	CD19 + IgM positiv
Wildtyp / $\Delta$ -iD	0,86	0,43
Wildtyp / $\Delta$ -RF2	0,45	0,29
$\Delta$ -iD / $\Delta$ -RF2	0,81	0,96

#### 4.1.3.3 Peyer-Plaques

Tabelle 11 zeigt den Mittelwert des Anteils IPSE-bindender Zellen der PCL der verschiedenen Mauslinien.

**Tab. 11:** Anteil IPSE-bindender Zellen der Peyer-Plaques

Peyer-Plaques	Anteil IPSE positiver an CD19 positiven	Anteil IPSE positiver an CD19 und IgM positiven
Wildtyp	3,6 %	4,8 %
$\Delta$ -iD	3,4 %	3,5 %
$\Delta$ -RF2	2,3 %	2,6 %

**Abb. 12:** Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent für die Peyer-Plaques, Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet:

pY0.05 → \* ; P<0.01 → \*\* ; P<0.001 → \*\*\*

Die Ergebnisse des Signifikanztests sieht man in Tabelle 12.

**Tab. 12:** T-Test für den Vergleich der IPSE-Bindung verschiedener Mauslinien für Peyer-Plaques

Peyer-Plaques	CD19 positiv	CD19 + IgM positiv
Wildtyp / $\Delta$ -iD	0,21	0,24
Wildtyp / $\Delta$ -RF2	0,10	0,49
$\Delta$ -iD / $\Delta$ -RF2	0,05	0,16

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei keinem der Gewebe ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Mauslinien im Anteil IPSE-bindender Zellen zu erkennen ist.

## 4.2 ELISA

### 4.2.1 Übersicht

Im nativen Antikörper-Repertoire finden sich IPSE-bindende Immunglobuline.

Für IgM und IgG<sub>1</sub> lässt sich im ELISA eine IPSE-Bindung nachweisen.

Auch nach Sensibilisierung mit Ovalbumin zeigen sich IPSE-bindende Antikörper.

### 4.2.2 IgM

Es lässt sich vor und nach Sensibilisierung IPSE-bindendes IgM nachweisen.

Dabei ist die absolute Konzentration an IPSE-bindendem IgM abzugrenzen vom relativen Anteil am Gesamt IgM

#### 4.2.2.1 Absolute Optische Dichte (OD) IPSE-bindender IgM

Tabelle 13 zeigt Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der optischen Dichte (OD) für die verschiedenen Mauslinien vor und nach Sensibilisierung nach Protokoll 1.

**Tab. 13:** Mittelwert und Standardabweichung der optischen Dichte vor und nach Sensibilisierung nach Protokoll 1 für IgM

<b>vor Sensibilisierung:</b>	<b>MW OD</b>	<b>SD OD</b>
<b>Wt</b>	<b>2,380</b>	<b>1,026</b>
<b>Δ-iD</b>	<b>0,533</b>	<b>0,079</b>
<b>Δ-RF2</b>	<b>0,771</b>	<b>0,240</b>
<b>nach Sensibilisierung:</b>	<b>MW OD</b>	<b>SD OD</b>
<b>Wt</b>	<b>2,371</b>	<b>0,793</b>
<b>Δ-iD</b>	<b>0,937</b>	<b>0,248</b>
<b>Δ-RF2</b>	<b>1,959</b>	<b>1,126</b>



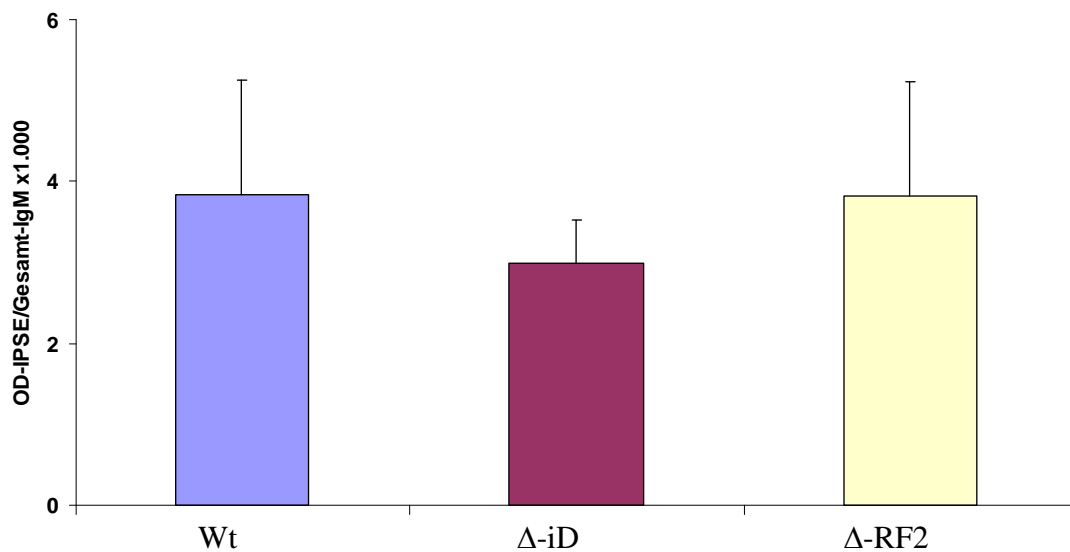
#### 4.2.2.2 Relative Optische Dichte (OD) IPSE-bindender IgM im Verhältnis zu Gesamt IgM

Die  $\Delta$ -RF2 und  $\Delta$ -iD Mäuse zeigen insgesamt erniedrigte IgM-Spiegel im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Darum ist der Quotient (Q) aus IPSE-bindendem IgM und Gesamt IgM aussagekräftiger als die absoluten Werte. Tabelle 14 zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung für diesen Quotienten vor und nach Sensibilisierung x 1.000.

**Tab. 14:** Mittelwert und Standardabweichung der relativen optischen Dichte x 1000 vor und nach Sensibilisierung nach Protokoll 1 für IgM

<b>Vor Sensibilisierung:</b>	<b>MW-Q</b>	<b>SD-Q</b>
<b>Wt</b>	3,84	1,4110
<b><math>\Delta</math>-iD</b>	2,99	0,5355
<b><math>\Delta</math>-RF2</b>	3,82	1,4238
<b>Nach Sensibilisierung:</b>	<b>MW OD</b>	<b>SD OD</b>
<b>Wt</b>	1,444	0,3433
<b><math>\Delta</math>-iD</b>	0,750	0,1215
<b><math>\Delta</math>-RF2</b>	1,124	0,2736

Da die IgM-Spiegel vor Sensibilisierung niedriger sind, ergibt sich eine höhere Fehleranfälligkeit. Je niedriger der Gesamt-IgM-Spiegel, desto stärker fallen einzelne Ausreißer ins Gewicht. Darum sind in Abbildung 13 Mittelwert und Standardabweichung für Tiere nach Sensibilisierung dargestellt.



**Abb. 13:** IPSE-IgM/Gesamt-IgM-Quotient

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Mauslinien. Die Ergebnisse des Signifikanztests (T-Test) sieht man in Tabelle 15.

**Tab. 15:** T-Test für den Vergleich des IPSE-IgM/Gesamt-IgM-Quotienten verschiedener Mauslinien

<b>Wt vs. Δ-iD</b>	0,3844
<b>Δ-iD vs. Δ-RF2</b>	0,3997
<b>Wt vs. Δ-RF2</b>	0,9849

### 4.2.3 IgG<sub>1</sub>

Es lässt sich vor und nach Sensibilisierung IPSE-bindende IgG<sub>1</sub> nachweisen. Auch hier ist die absolute Konzentration an IPSE-bindendem IgG<sub>1</sub> abzugrenzen vom relativen Anteil am Gesamt IgG<sub>1</sub>.

#### 4.2.2.1 Absolute OD IPSE-bindender IgG<sub>1</sub>

Tabelle 16 zeigt Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der optischen Dichte (OD) für die verschiedenen Mauslinien für das Sensibilisierungsprotokoll 1.

**Tab. 16:** Mittelwert und Standardabweichung der optischen Dichte vor und nach Sensibilisierung nach Sensibilisierungsprotokoll 1 für IgG<sub>1</sub>

<b>Vor Sensibilisierung:</b>	<b>MW OD</b>	<b>SD OD</b>
<b>Wt</b>	0,362	0,158
<b>Δ-iD</b>	0,124	0,065
<b>Δ-RF2</b>	0,493	0,532
<b>Nach Sensibilisierung:</b>	<b>MW OD</b>	<b>SD OD</b>
<b>Wt</b>	3,500	0,000
<b>Δ-iD</b>	1,962	0,775
<b>Δ-RF2</b>	2,831	0,901

Tabelle 17 zeigt denselben Zusammenhang für Tiere mit Sensibilisierungsprotokoll 2.

**Tab. 17:** Mittelwert und Standardabweichung der optischen Dichte vor und nach Sensibilisierung nach Sensibilisierungsprotokoll 2 für IgG<sub>1</sub>

<b>Sensibilisierung mit PBS:</b>	<b>MW OD</b>	<b>SD OD</b>
<b>Wt</b>	0,182	0,139
<b>Δ-iD</b>	0,035	0,016
<b>Δ-RF2</b>	0,275	0,097
<b>Sensibilisierung mit OVA:</b>	<b>MW OD</b>	<b>SD OD</b>
<b>Wt</b>	1,081	0,867
<b>Δ-iD</b>	0,518	0,486
<b>Δ-RF2</b>	1,056	1,097

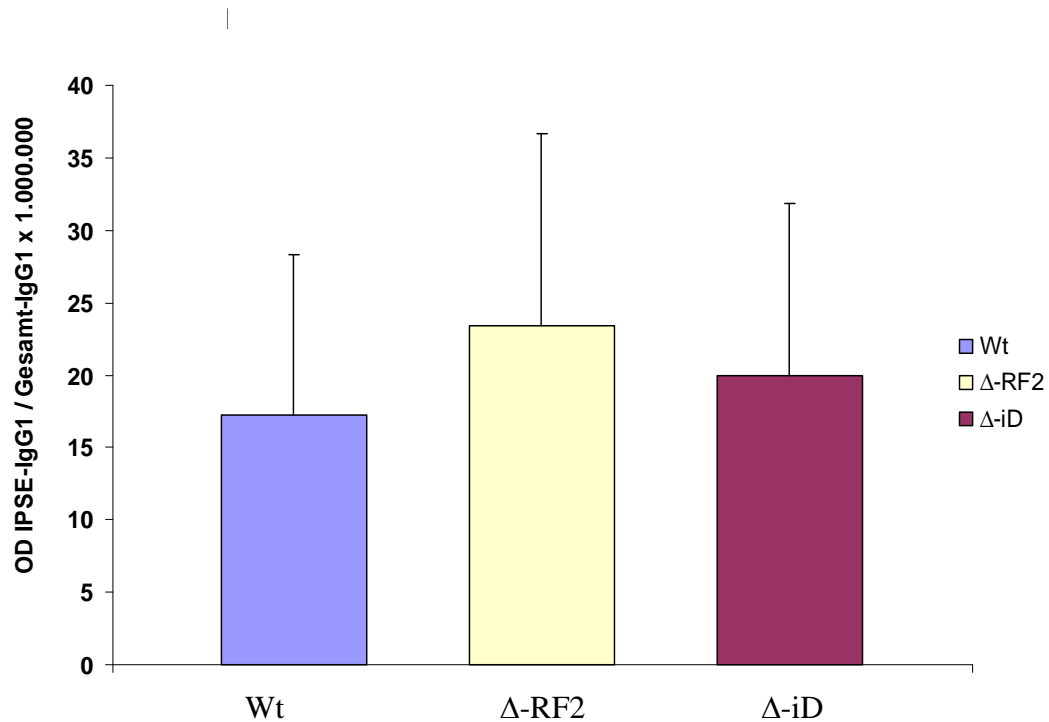
#### 4.2.2.2 Relative Optische Dichte (OD) IPSE-bindender IgG<sub>1</sub> im Verhältnis zu Gesamt IgG<sub>1</sub>

Die Δ-RF2 und Δ-iD Mäuse zeigen insgesamt erniedrigte IgG<sub>1</sub>-Spiegel im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Darum ist der Quotient (Q) aus IPSE-bindendem IgG<sub>1</sub> und Gesamt IgG<sub>1</sub> aussagekräftiger als die absoluten Werte. Tabelle 18 zeigt den Quotienten aus IPSE-bindender IgG<sub>1</sub> und Gesamt IgG<sub>1</sub> x 1.000.000. Die Tiere wurden zu gleichen Teilen nach Protokoll 1 und 2 sensibilisiert.

**Tab. 18:** Mittelwert und Standardabweichung der relativen optischen Dichte vor und nach Sensibilisierung für IgG<sub>1</sub>

	Ohne Sensibilisierung	OVA
<b>Wt</b>	111,6	17,2
<b>Δ-iD</b>	35,0	20,0
<b>Δ-RF2</b>	113,2	23,4

Da die IgG<sub>1</sub>-Spiegel vor Sensibilisierung niedriger sind, ergibt sich eine höhere Fehleranfälligkeit. Je niedriger der Gesamt-IgG<sub>1</sub>-Spiegel, desto stärker fallen einzelne Ausreißer ins Gewicht. Darum sind in Abbildung 14 Mittelwert und Standardabweichung für Tiere nach Sensibilisierung dargestellt.



**Abb. 14:** IPSE-IgG1/Gesamt-IgG1-Quotient

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Mauslinien. Die Ergebnisse des Signifikanztests (T-Test) sieht man in Tabelle 19:

**Tab. 19:** T-Test für den Vergleich des IPSE-IgG<sub>1</sub>/Gesamt-IgG<sub>1</sub>-Quotienten verschiedener Mauslinien

<b>Wt vs. <math>\Delta</math>-RF2</b>	0,34
<b>Wt vs. <math>\Delta</math>-iD</b>	0,64
<b><math>\Delta</math>-RF2 vs. <math>\Delta</math>-iD</b>	0,60

## 5. Diskussion

### 5.1 Kritische Betrachtung des murinen Modells

Die FACS-Analyse und der Serum-ELISA wurden an Mäusen durchgeführt. IPSE kann an Immunglobuline des Menschen und der Maus binden. Dadurch kann es Mastzellen beider Spezies zur Degranulation bringen, wodurch IL-4 freigesetzt wird (Schramm *et al.* 2003). Darum ist die Wirkung des IPSE bei Mensch und Maus vergleichbar. Unterschiede findet man im weiteren Verlauf. Durch IL-4 wird eine  $T_H2$ -Reaktion induziert. Beim Menschen führt dies unter anderem zur Produktion von IgE und IgG<sub>4</sub>. Bei der Maus wird dagegen IgE und IgG<sub>1</sub> sezerniert (Corry *et al.* 1999; Busse *et al.* 2001; Janeway *et al.* 2005). Dies sollte jedoch keinen Einfluss auf die Frage haben, wie IPSE an Immunglobulinen bindet. Die Bindung an Antikörper sollte bei Maus und Mensch gleich verlaufen, da Ähnlichkeiten sowohl in der CDR-H3-Region als auch in den  $V_H$ -Familien existieren (Zemlin *et al.* 2003). Bei beiden Spezies dominieren Tyrosin, Glycin und Serin in den CDR-H3-Regionen. Allerdings gibt es auch Unterschiede in der Zusammensetzung der humanen und murinen CDR-H3-Regionen. Die menschlichen CDR-H3-Regionen sind durchschnittlich 3-4 Aminosäuren länger und besitzen daher eine größere Diversität. Man findet häufiger als in der Maus Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten, die in der Keimbahn programmiert sind und Wasserstoffbrücken zwischen Prolinresten, die während der somatischen Rekombination entstehen. In Mäusen findet sich ein relativ uniformes Repertoire mit an Tyrosin reichen CDR-H3 Schleifen und Wasserstoffbrückenbindungen (Zemlin *et al.* 2003).

Trotz dieser Unterschiede sind beide Spezies fähig, sehr ähnliche Antigene zu erkennen und mittels Affinitätsreifung hochaffine Antikörper zu produzieren. Darum sollte es beiden möglich sein, klassischerweise Antigene zu binden, indem sie Immunglobuline mit der passenden CDR-H3-Region selektionieren. Falls IPSE also als klassisches Antigen bindet, so wäre dieses Ergebnis von der Maus auf den Menschen übertragbar. Für die Bindung als Superantigen sind die  $V_H$ -Familien entscheidend (Pascual *et al.* 1992, Adderson *et al.* 1993, Berberian *et al.* 1993, Ikematsu *et al.* 1993, Newkirk *et al.* 1993, Domiati-Saad *et al.* 1996, reviewed in: Silverman 1992; Marone *et al.* 2006). Hier gibt es eine eindeutige Verwandtschaft zwischen humanen und murinen  $V_H$ -Familien. Beim Menschen gibt es sieben  $V_H$ -

Familien: V<sub>H</sub>1 bis V<sub>H</sub>7. Bei der Maus unterscheidet man 15 Untergruppen und acht Sets. Die Sets entsprechen dabei den humanen V<sub>H</sub>-Familien. Den menschlichen Familien V<sub>H</sub>3 und V<sub>H</sub>4 entsprechen jeweils zwei verwandte Sets bei Mäusen. Die Sets V<sub>H</sub>3a und V<sub>H</sub>3b sowie V<sub>H</sub>4a und V<sub>H</sub>4b ähneln sich dabei untereinander mehr als anderen murinen Sets. V<sub>H</sub>1, V<sub>H</sub>2 und V<sub>H</sub>7 haben jeweils eine Entsprechung. V<sub>H</sub>5 und V<sub>H</sub>6 haben keine Entsprechung bei den murinen V<sub>H</sub>-Familien. Ebenso wenig gibt es ein humanes Pendant zur murinen V<sub>H</sub>8-Sets. Diese Familien, die keine Verwandtschaft zueinander aufweisen, enthalten jeweils nur ein oder zwei Sequenzen. Diese Familien spielen also eine untergeordnete Rolle (de Bono *et al.* 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es zwar Unterschiede zwischen menschlichen und murinen Immunglobulinen gibt, aufgrund der großen Verwandtschaft zwischen den Prinzipien der Immunglobulin-Repertoires und der Antigen-Erkennung sind jedoch die Ergebnisse zur IPSE-Bindung von der Maus auf den Menschen übertragbar.

## **5.2 IPSE-bindende B-Lymphozyten verschiedener Mauslinien**

Es konnte eine IPSE-Bindung für naive, CD19 positive B-Lymphozyten in allen untersuchten Mauslinien nachgewiesen werden. Der quantitative Nachweis war jedoch nur für IgM positive, CD19 positive Lymphozyten möglich. Aufgrund der geringen Zahl von IgA-, IgE- und IgG-positiven B-Lymphozyten war hier die quantitative Analyse unmöglich. Durchschnittlich binden 2,7 % aller naiven, CD19-positiven B-Lymphozyten IPSE. Für die CD19 und IgM positiven Zellen beträgt der Wert 3,4 %. Es binden also ca. 3 % der naiven B-Lymphozyten IPSE. Dabei zeigt sich kein wesentlicher Unterschied in der IPSE-Bindungsfähigkeit der verschiedenen Mauslinien. Lediglich zwischen den CD19-positiven Zellen der Milz gibt es zwischen  $\Delta$ -iD und Wildtyp Mäusen einen signifikanten Unterschied. Es wurden 18 Vergleiche der Mauslinien in unterschiedlichen Geweben durchgeführt. Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass sich die IPSE-Bindungsfähigkeit der Lymphozyten der Wildtyp,  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 Mäuse nicht unterscheidet. Dies spricht dafür, dass IPSE ein Superantigen ist.

Die Superantigenbindung wird durch Daten unterstützt, die von Schramm *et al.* 2007 erhoben wurden. IPSE bindet an IgE und Mastzellen und bringt diese zur Degranulation. Dies geschieht bereits beim ersten Antigenkontakt. Dies legt die Vermutung nahe, dass IPSE antigenunabhängig an IgE bindet. Es konnte auch eine Bindung IPSEs an IgG nachgewiesen werden (Schramm *et al.* 2007). Ein weiteres Argument für die Superantigenbindung IPSEs ist, dass 2,7 % der naiven B-Lymphozyten IPSE binden. Es bestand vorher kein Kontakt zum Antigen. Darum würde man bei klassischer Antigenbindung erwarten, dass ein viel geringerer Teil der B-Lymphozyten IPSE bindet. Bei Mäusen gibt es acht  $V_H$ -Sets (de Bono *et al.* 2004). 3 % kann damit dem Anteil eines  $V_H$ -Sets der Maus entsprechen. Die Wildtyp,  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 Mäuse unterscheiden sich nicht in ihren  $V_H$ -Sets sondern lediglich in ihrer CDR-H3-Region (Ippolito *et al.* 2003; Zemlin *et al.* 2008, Schelonka *et al.* 2008). Bei einer Superantigenbindung würde man also bei allen drei Mauslinien denselben Anteil an bindenden Zellen erwarten, der dem des bindenden  $V_H$ -Sets entspricht. Hierzu passt die IPSE-Bindung von 3% durch die B-Lymphozyten der Wildtyp,  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 Mäuse.

### **5.3 IPSE-bindende Immunglobuline**

Im ELISA konnte eine IPSE-Bindung durch IgM und IgG<sub>1</sub> nachgewiesen werden. Dies korreliert mit Daten, dass alle Isotypen IPSE binden können (Schramm *et al.* 2007; Blindow *et al.*, unveröffentlicht). Um ausreichende Mengen der Immunglobuline zu erhalten, wurden die Tiere mit Ovalbumin immunisiert. IgM und IgG kommen in großen Mengen im Serum vor. IgE ist dagegen nur in geringen Mengen im Serum vorhanden. Der größte Anteil ist auf Mastzellen und Basophilen gebunden (Janeway *et al.* 2005). Das IgG<sub>1</sub> ist von besonderem Interesse, da es bei Mäusen bei T<sub>H</sub>2-Reaktion neben dem IgE erhöht ist (Corry und Kheradmand 1999; Busse und Lemanske Jr. 2001). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in der IPSE-Bindung durch die Immunglobuline der verschiedenen Mauslinien nachweisen. In der FACS-Analyse zeigte sich kein Unterschied in der IPSE-Bindung durch naive B-Lymphozyten. Diese Daten sprechen dafür, dass IPSE ein Superantigen ist.



#### **5.4 IPSE-bindende B-Lymphozyten verschiedener Gewebe**

Beim Vergleich von B-Lymphozyten der Milz, der Peritonealhöhle und der Peyer-Plaques zeigte sich, dass die Lymphozyten der Peyer-Plaques weniger IPSE-bindende Zellen besitzen als die der Milz und Peritonealhöhle. Bei  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 Mäusen war dieser Unterschied nur teilweise signifikant. Doch er war für alle drei Mauslinien ein gleichgerichteter Trend zu erkennen. Die IPSE-bindenden B-Lymphozyten finden sich folglich mit einem geringeren Anteil in den Peyer-Plaques des Darms. IPSE selbst wird als Bestandteil des Antigens der Schistosomeneier SmEA vor allem in der Leber gefunden, wo die Eiablage erfolgt. In den Mesenterialvenen finden sich dagegen die adulten Würmer. Letztere induzieren eine moderate  $T_H1$ -Reaktion. Die für die Krankheitsbekämpfung essenzielle  $T_H2$ -Reaktion wird dagegen durch IPSE ausgelöst (Pearce *et al.* 2002; Stadecker *et al.* 2004; Schramm *et al.* 2003).

IPSE als Superantigen ermöglicht eine frühe  $T_H2$ -Antwort, ohne vorherigen Antigenkontakt. Dadurch kann die *Schistosoma mansoni* Infektion schneller bekämpft werden. Dazu müssen sich die IPSE-bindenden Zellen dort befinden, wo der Kontakt mit IPSE erfolgt, also die Eiablage erfolgt. Dies ist in der Leber der Fall. In den Mesenterialvenen befinden sich nur wenige Eier, dafür aber der adulte Wurm. Die Eier werden über das Blut fortgeschwemmt. Der Nutzen IPSE-bindender B-Lymphozyten in den Peyer-Plaques ist deshalb beschränkt. Es stellt sich allerdings die Frage, ob es dem Immunsystem möglich ist, eine dementsprechende Selektion der B-Lymphozyten durchzuführen. Die einzelnen  $V_H$ -Familien stellen jeweils einen bestimmten Anteil an den acht Familien der Mäuse. Um die Unterschiede der Gewebe zu erreichen, müssten B-Lymphozyten mit einer bestimmten  $V_H$ -Familie in einem bestimmten Gewebe angereichert (Milz, Peritonealhöhle) oder verringert werden (Peyer-Plaques). Es ist auffällig, dass die Unterschiede zwischen Peyer-Plaques und Milz beziehungsweise Peritonealhöhle besonders deutlich bei den Wildtypmäusen erkennbar waren. Bei den  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 Mäusen dagegen war dieser Unterschied zwar erkennbar aber nicht in allen Vergleichen signifikant. Falls es Mechanismen gibt, die eine Selektion der B-Lymphozyten einer bestimmter  $V_H$ -Familie in speziellen immunologischen Geweben erlauben, so scheinen diese bei den  $\Delta$ -iD und  $\Delta$ -RF2 Mäusen im Vergleich zum Wildtyp gestört zu sein.

### **5.5 Immunologische Bedeutung**

Um die Bedeutung von IPSE als Superantigen darzustellen, ist es notwendig, Superantigene generell zu betrachten. Da Superantigene meist Bestandteil häufig vorkommender Krankheitserreger sind, wurde die These aufgestellt, dass sie eine frühe humorale Immunantwort darstellen, die dem angeborenen Immunsystem gleicht (Snow *et al.* 1996, Hofer *et al.* 1999). Das Immunsystem hätte damit während der Evolution  $V_H$ -Familien erzeugt, die Antigene häufiger Krankheitserreger binden. Ein Beispiel hierfür ist das *Staphylococcus aureus* Protein A. Dieses wird hauptsächlich durch Immunglobuline gebunden, deren  $V_H$ -Segmente zur  $V_H3$ -Familie gehören (Sasso *et al.* 1989). *Staphylococcus aureus* ist ein weit verbreiteter Krankheitserreger. Es scheint also sinnvoll, eine große Anzahl an Immunglobulinen zu besitzen, die seine Antigene binden. Schistosomen sind in tropischen Ländern weit verbreitet. Schätzungen zufolge sind 250 – 300 Millionen Menschen infiziert. Als sich das menschliche Immunsystem entwickelte, war es wahrscheinlich auch Schistosomen in größerer Zahl ausgesetzt. Daher scheint es sinnvoll, auch eine größere Anzahl an Immunglobulinen gegen Schistosomenantigene zu besitzen. Es können bei Erstkontakt mit Schistosomen sofort Antigene gebunden werden. Nach Eiablage erfolgt die  $T_H2$ -Reaktion. Bleibt diese aus, ist die Infektion hochpathologisch und kann tödlich verlaufen (Stadecker *et al.* 2004). Die frühe  $T_H2$ -Reaktion wird dabei durch IPSE verursacht. Dies ist möglich, da IPSE Antigen-unspezifisch an IgE binden und damit Mastzellen zur Degranulation bringen kann (Schramm *et al.* 2003).

Das Besondere an IPSE ist, dass es Mastzellen antigenunabhängig ohne Quervernetzung von membrangebundenem IgE zur Degranulation bringt. Dies stellt einen alternativen Weg der Mastzellaktivierung dar. Die  $T_H2$ -Reaktion und Mastzellaktivierung sind zentrale Mechanismen der allergischen Reaktion. Bei Allergien tritt nach Antigenkontakt eine systemische Sensibilisierung auf. Allergene prägen dabei die Immunantwort im Sinne eines  $T_H2$ -Phänotyps (Corry und Kheradmand 1999). Es kommt zur  $T_H2$ -Reaktion und zur Produktion von allergenspezifischem IgE. Dieses wird auf Mastzellen gebunden (Laitinen *et al.* 2004, Moffatt *et al.* 2007, Hui *et al.* 2008). Der Mastzellaktivierung geht dabei eine Sensibilisierung voraus, während der allergenspezifisches IgE gebildet wird. Die Mastzellaktivierung ist nach diesem Modell Folge der  $T_H2$ -Reaktion. Die Freisetzung von IL-4 dient dabei dem Erhalt der  $T_H2$ -Antwort. Die  $T_H2$ -Reaktion

bei Kontakt mit IPSE ist nicht Voraussetzung für die Mastzelldegranulation sondern deren Folge. Es muss keine Bildung antigenspezifischer Immunglobuline erfolgen, da IPSE als Superantigen bindet. Einige Untersucher fanden in Patienten mit Allergien eine Bevorzugung bestimmter  $V_H$ -Familien im IgE-Molekül. Darum wurde auch für einige Allergene postuliert, dass sie als B-Zell-Superantigene binden. Diese Allergene wurden Superallergene genannt (Marone *et al.* 2006). IPSE als alternativer IgE-Ligand eröffnet also Möglichkeiten, Allergien und Atopie besser zu verstehen.

Sind die Mechanismen klar, wie IPSE Mastzellen ohne Quervernetzung von IgE zur Degranulation bringt, so kann dies zu neuen Therapieansätzen der Allergiebehandlung führen. Als erster Schritt ist hierbei zu verstehen, wie und wo IPSE am Immunglobulin bindet. Die Entwicklung des IgE-Antikörpers Omalizumab kann die Mastzelldegranulation auf Ebene des IgE allgemein hemmen. Jedoch sollte das Ziel sein, speziell das IgE zu hemmen, das für die allergische Reaktion verantwortlich ist. Stellt man fest, welche  $V_H$ -Familien bevorzugt ein bestimmtes Superantigen beziehungsweise Superallergen binden, so könnte man Antikörper speziell gegen diese  $V_H$ -Familie entwickeln.

## **5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse**

IPSE-bindende naive CD19-positive B-Lymphozyten ließen sich in der FACS-Analyse nachweisen. Der quantitative Nachweis war jedoch nur für IgM positive B-Lymphozyten möglich. Eine IPSE-Bindung der IgA, IgG und IgE positiven naiven B-Lymphozyten ließ sich nur qualitativ nachweisen. Eine Quantifizierung der IPSE-bindenden Zellen mittels FACS Analyse war aufgrund der sehr geringen Anzahl in diesen Zellpopulationen nicht möglich. Im ELISA konnten IPSE-bindende Immunglobuline nachgewiesen werden. Um die drei Mauslinien hinsichtlich ihrer spontanen Produktion IPSE-bindender Immunglobuline zu überprüfen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Nachweise für IPSE-spezifisches IgM und IgG<sub>1</sub> etabliert, da diese beiden Isotypen in relativ hoher Konzentration im Serum vorkommen. Bei der FACS-Analyse banden im Durchschnitt 2,7 % aller naiven B-Lymphozyten IPSE. Bei sämtlichen Vergleichen der B-Lymphozyten aus Milz, Peritonealhöhle und Peyer-Plaques zeigten sich zwischen den verschiedenen Mauslinien keine signifikanten Unterschiede in der

IPSE-Bindungsfähigkeit. Lediglich der Vergleich zwischen IgM-positiven B-Lymphozyten der Milz von  $\Delta$ -iD und Wildtypmäusen und der Vergleich der Gesamt-B-Lymphozyten der Peyer-Plaques von  $\Delta$ -iD Mäusen und  $\Delta$ -RF2 Mäusen erreichte ein Signifikanzniveau von  $<0.05$ . Dies könnte für einen vorhandenen, aber sehr geringen Einfluss der CDR-H3-Region auf die IPSE-Bindung hinweisen. Da das Signifikanzniveau im zweiseitigen T-Test lediglich in zwei von 18 Vergleichen erreicht wurde, kann die CDR-H3-Region allenfalls eine sehr untergeordnete Rolle bei der IPSE-Bindung spielen. Da sich insgesamt die B-Lymphozyten der Mauslinien trotz der extrem entgegen gesetzten Zusammensetzung ihrer CDR-H3-Regionen in ihrer IPSE-Bindungsfähigkeit nahezu nicht unterschieden, interpretieren wir die FACS-Analysen als Hinweis auf eine weit überwiegend Superantigen-artige Bindung von IPSE am membranständigen Immunglobulin. Diese Schlussfolgerung wird durch die ELISA-Ergebnisse unterstützt. Im ELISA zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IPSE-Bindungsfähigkeit durch IgM und IgG<sub>1</sub> für die verschiedenen Mauslinien.

Beim Vergleich der verschiedenen Gewebe in der FACS-Analyse ergaben sich bei Wildtyp- und  $\Delta$ -iD Mäusen in 7 von 18 Vergleichen signifikante Unterschiede hinsichtlich der IPSE-Bindungsfähigkeit der B-Lymphozyten, wobei die übrigen Vergleiche weit überwiegend gleichgerichtete Trends aufwiesen. Beispielsweise waren in den Peyer-Plaques von Wildtyp-Mäusen weniger IPSE-bindende B-Lymphozyten als in Milz und Peritonealhöhle nachzuweisen. Ebenso fanden sich in Peyer-Plaques von  $\Delta$ -iD Mäusen weniger IPSE-bindende IgM-positive B-Lymphozyten als in der Milz. Für die  $\Delta$ -RF2 Mäuse zeigten sich bei den IgM positiven Zellen auch eine geringere IPSE-Bindung durch die Peyer-Plaques als durch die Milz. Zusammenfassend wiesen die FACS- und ELISA-Analysen auf eine Superantigen-artige Bindung von IPSE am Immunglobulin hin. Beim Vergleich zwischen verschiedenen Geweben waren die Ergebnisse uneinheitlicher und sprachen für eine geringere IPSE-Bindung der B-Lymphozyten in den Peyer-Plaques im Vergleich zu Milz und Peritonealhöhle.

## **5.7 Schlussfolgerung**

IPSE kann Mastzellen ohne Quervernetzung von IgE-Molekülen und ohne vorherige Sensibilisierung zur Degranulation bringen. Hierbei handelt es sich also um einen bisher unbekannten Mechanismus, dessen Bedeutung bei der Typ1-Allergie bisher ungeklärt ist. Die Aufklärung des Mechanismus könnte neue therapeutische Optionen zur Allergiebehandlung eröffnen. Wir konnten zeigen, dass IPSE im Sinne eines Superantigens an Immunglobuline gebunden wird. B-Lymphozyten verschiedener immunologischer Kompartimente können IPSE in unterschiedlichem Ausmaß binden. Deshalb soll in weiteren Untersuchungen geprüft werden, wie sich die B-Lymphozyten verschiedener Kompartimente unterscheiden, z.B. durch bevorzugte Nutzung von Variable-Gen-Segmenten.

## 6. Literaturverzeichnis

Abbas, A; Murphy, K; Sher, A..“ Functional diversity of helper T lymphocytes.” Nature 1996; 282(6603): 787-93

Achatz, G; Achatz-Straussberger, G; Luger, E; Lamers, R; Cramer, R. “Regulation of the IgE response at the molecular level: impact on the development of systemic anti IgE therapeutic strategies.” Chem Immunol Allergy 2006; 91: 204-17

Adderson, EE; Shackelford, PG; Quinn, A; Wilson, PM; Cunningham, MW; Insel, RA; Carroll, WL. “Restricted immunoglobulin VH usage and VDJ combinations in the human response to Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide. Nucleotide sequences of monospecific anti-Haemophilus antibodies and polyspecific antibodies cross-reacting with self antigens.” J Clin Invest 1993; 91(6): 2734-43

Alt, FW; Oltz, EM; Young, F; Gorman J; Taccioli, G; Chen, J. “VDJ recombination.” Immunol Today 1992; 13: 306-14

Andréasson, U; Flicker, S; Lindstedt, M; Valenta, R; Greiff, L; Korsgren, M; Borrebaeck, CA; Ohlin, M. “The human IgE-encoding transcriptome to assess antibody repertoires and repertoire evolution.” J Mol Biol 2006; 362(2) 212-27

Bach, JF. “Mechanisms of disease: the effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.” N Engl J Med 2002; 347(12): 911-20

Bauer, K; Hummel, M; Berek, C; Paar, C; Rosenberger, C; Kerzel, S; Versmold, H; Zemlin, M. “Homology-directed recombination in IgH variable region genes from human neonates, infants and adults: implications for junctional diversity.” Mol Immunol 2007; 44(11): 2969-77

Beaven, MA; Metzger, H. “Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case.” Immunol Today 1993; 14(5): 222-6

Benedict, CL; Gilfillan, S; Thai, TH; Kearney, JF. "Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development." *Immun Rev* 2000; 175: 150-7

Berberian, L; Goodglick, L; Kipps, TJ; Braun, J. "Immunoglobulin VH3 gene products: natural ligands for HIV gp120." *Science* 1993; 261(5128): 1588-91

Berek, C; Berger, A; Apel, M. "Maturation of the immune response in germinal centres." *Cell* 1991; 67: 1121-9

Besmer, E; Gourzi, P; Papavasilio, FN. "The regulation of somatic hypermutation." *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 241-5

Betz, AG; Neuberger, MS; Milstein, C. "Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes." *Immunol Today* 1993; 14(8): 405-1

Bieber, T. "Fc epsilon RI on antigen-presenting cells." *Curr Opin Immunol* 1996; 8(6): 773-7

Blom, B; Spits, H. "Development of human lymphoid cells." *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 287-320

Boes, M. "Role of natural and immune IgM antibodies in immune response." *Mol Immunol* 2000; 37: 1141-9

Bridges, SL Jr. "Frequent N addition and clonal relatedness among immunoglobulin lambda light chains expressed in rheumatoid arthritis synovia and PBL, and the influence of V lambda gene segment utilisation on CDR3 length." *Mol Med* 1998; 4: 525-53

Busse, WW; Lemanske RF Jr. "Asthma." *N Engl J Med* 2001; 344(5): 350-62

Chowdhury, D; Sen, R. "Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements." *Immunol Rev* 2004; 200: 182-96

Collis, AV; Brouwer, AP; Martin, AC. "Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen." *J Mol Biol* 2003; 325(2): 337-54

Cook, GP; Tomlinson, IM; Walter, G; Riethman, H; Carter NP; Buluwela, L; Winter, G; Rabbitts, TH. "A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q." *Nat Genet* 1994; 7(2): 162-8

Cooper, M.D. "Current concepts. B lymphocytes. Normal development and function." *N Engl J Med* 1987; 317: 1452-6

Corry, DB; Kheradmand, F. "Introduction and regulation of the IgE response." *Nature* 1999; 402(Suppl): B18-B23

Desiderio, SV; Yancopoulos, GD; Paskind, M; Thomas, E; Boss, MA; Landau, N; Alt, FW; Baltimore, D. "Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells." *Nature* 1984; 311: 752-5

Dittrich AM, Erbacher A, Specht S, Diesner F, Krokowski M, Avagyan A, Stock P, Ahrens B, Hoffmann WH, Hoerauf A, Hamelmann E. Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol*. 2008; 180(3): 1792-9

Domati-Saad, R; Attrep, JF; Brezinschek, HP; Cherrie, AH; Karp, DR; Lipsky, PE. "Staphylococcal enterotoxin D functions as a human B cell superantigen by rescuing VH4-expressing B cells from apoptosis." *J Immunol* 1996; 156(10): 3608-20



Domiati-Saad, R; Lipsky, PE. "Staphylococcal enterotoxin A induces survival of VH3-expression human B cells by binding to the VH region with low affinity." J Immunol 1998; 161: 1257-66

Eder, W; Ege, MJ; von Mutius, E. "The asthma epidemic." N Engl J Med 2006; 355(21): 2226-35.

Edwards, MR; Brouwer, W; Choi, CH; Ruhno, J; Ward, RL; Collins, AM. "Analysis of IgE antibodies from a patient with atopic dermatitis: biased V gene usage and evidence for polyreactive IgE heavy chain complementarity-determining region 3." J Immunol 2002; 168(12): 6305-13

Efremov, DG; Batista, FD; Burrone, OR. "Molecular analysis of IgE H-chain transcripts expressed in vivo by peripheral blood lymphocytes from normal and atopic individuals." J Immunol 1993; 151(4): 2195-207

Flicker, S; Steinberger, P; Norderhaug, L; Sperr, WR; Majlesi, Y; Valent, P; Kraft, D; Valenta, R. "Conversion of grass pollen allergen-specific human IgE into a protective IgG(1) antibody." Eur J Immunol 2002; 32(8): 2156-62

Geisberger, R; Lamers, M; Achatz, G. "The riddle of the dual expression of IgM and IgD." Immunology 2006; 118: 429-37

Giudicelli, V; Duroux, P; Ginestoux, C; Folch, G; Jabado-Michaloud, J; Chaume, D; Lefranc, MP. "IMGT/LIGM-DB; the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences." Nucleic Acids Res 2006; 34: D781-4

Han, S; Zhang, X; Xu, R; Finkelmann, FD; Brombacher, F; Zheng, B. "IgD+IgM- B cells mount immune response that exhibit altered antibody repertoire." J Immunol 2004; 34: 661-8

Hofer, MF; Harbeck, RJ; Schlievert, PM; Leung, DY. „Staphylococcal toxins augment specific IgE responses by atopic patients exposed to allergen.” *J Invest Dermatol* 1999; 112(2): 171-6

Holgate, ST. “The epidemic of allergy and asthma.” *Nature* 1999; 402(6760 Suppl): B2-B4

Holt, P.; Macaubas, P.; Stumbles, P; Sly, P. “The role of allergy in the development of asthma.” *Nature* 1999; 402(Supplement): B12-B17

Honjo, T; Nagaoka, H; Shinkura, R; Muramatsu, M. “AID to overcome the limitations of genomic information.” *Nat Immunol* 2005; 6(7): 655-61.

Hui, J; Oka, A; James, A; Palmer, LJ; Musk, AW; Beilby, J; Inoko, H. “A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population.” *Hum Genet* 2008; epub ahead of print

Ikematsu, H; Harindranath, N; Ueki, Y; Notkins, AL; Casali, P. “Clonal analysis of a human antibody response. II. Sequences of the VH genes of human IgM, IgG, and IgA to rabies virus reveal preferential utilization of VHIII segments and somatic hypermutation.” *J Immunol* 1993; 150(4): 1325-37

Ippolito GC, Pelkonen J, Nitschke L, Rajewsky K, Schroeder HW Jr. “Antibody repertoire in a mouse with a simplified D(H) locus: the D-limited mouse.” *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987: 262-5

Ivanov, I; Link, J; Ippolito, G; Schroeder, H. “Constraints on hydrophobicity and sequence composition of HCDR3 are conserved across evolution.” In *The Antibodies*; M. Zanetti & J.D. Capra: pp. 43–67. Taylor and Francis Group. London 2002

Janeway, C.A; Travers, P; Walport, M; Shlomchik, M.J. “Immunobiology”, 6th Edition, Garland Science, New York and London, 2005

Johnson, G; Wu, TT. "Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot." *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 214–8

Jumper, MD; Splawski, JB; Lipsky, PE; Meek, K. "Ligation of CD40 induces sterile transcripts of multiple Ig H chain isotypes in human B cells." *J Immunol* 1994; 152: 438-45

Keown, M; Young, RJ; Henry, AJ; Owens, RJ; Gould, HJ; Sutton, BJ. "The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation." *Nat Immunol* 2002; 3(7): 681-6

Laffer, S; Steinberger, P; Kraft, D; Valenta, R. "Promiscuous use of light chains by human IgE antibodies specific for three major grass pollen allergens." *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124(1-3): 29-30

Laitinen, T; Polvi, A; Rydman, P; Vendelin, J; Pulkkinen, V; Salmikangas, P; Mäkelä, S; Rehn, M; Pirskanen, A; Rautanen, A; Zucchelli, M; Gullstén, H; Leino, M; Alenius, H; Petäys, T; Haahtela, T; Laitinen, A; Laprise, C; Hudson, TJ; Laitinen, LA; Kere, J. "Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits." *Science* 2004; 304(5668): 300-4

Lane, S.; Lee, T. "Mast cell effector mechanisms." *J Allergy Clin Immunol* 1997; 98: S67-S72

Li, YS; Hayakawa, K; Hardy, RR. "The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver." *J Exp Med* 1993; 178: 95-160

Maddox, L; Schwartz, DA. "The pathophysiology of asthma." *Annu Rev Med* 2002; 53: 477-98

Maizels, N. "Immunoglobulin gene diversification." *Annu Rev Genet* 2005; 39: 23-46

Matsuda, F; Ishii, K; Bourvagnet, P; Kuma, K; Hayashida, H; Miyata, T; Honjo, T. "The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus". J Exp Med 1998 ; 188(11) : 2151-62

Marone, G; Spadaio, G; Liccardo, B; Rossi, FW; D'Orio, C; Detoraki, A. "Superallergens: a new mechanism of immunologic activation of human basophils and mast cells." Inflamm Res 2006; 55 Suppl 1: S25-7

MacCallum, RM; Martin, AC; Thornton, JM. "Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography." J Mol Biol 1996; 262: 732-45

Moffatt, MF; Kabesch, M; Liang, L; Dixon, AL; Strachan, D; Heath, S; Depner, M; von Berg, A; Bufe, A; Rietschel, E; Heinzmann, A; Simma, B; Frischer, T; Willis-Owen, SA; Wong, KC; Illig, T; Vogelberg, C; Weiland, SK; von Mutius, E; Abecasis, GR; Farrall, M; Gut, IG; Lathrop, GM; Cookson, WO. "Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma." Nature 2007; 448(7152): 470-3.

Muramatsu, M; Sankaranand, VS; Anant, S; Sugai, M; Kinoshita, K; Davidson, NO, Honjo, T. "Specific expression of activation-induced cytidine deaminas (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells." J Biol Chem 1999; 274: 18470-6

Newkirk, MM; Rauch, J; Mageed, RA; Jefferis, R; Posnett, DN; Silverman, GJ. "Restricted immunoglobulin variable region gene usage by hybridoma rheumatoid factors from patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." Mol Immunol 1993; 30(3): 255-63

Padlan, EA. "Anatomy of the antibody molecule." Mol Immunol 1994; (3): 169-217

Pascual, V; Capra, J.D. "Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: organization, polymorphism, and expression." Adv Immunol 1991; 49: 1-74

Pascual, V; Capra, JD. "VH4-21, a human VH gene segment overrepresented in the autoimmune repertoire." *Arthritis Rheum* 1992; 35(1): 11-8

Poljak, R.J.; Amzel, LM; Phizackerly, RP. "Studies on the three-dimensional structure of immunoglobulins." *Prog Biophys Mol Biol* 1976; 31: 67-93

Rajewsky, K. "Clonal selection and learning in the antibody system." *Nature* 1996; 381(6585): 751-8.

Sasso, EH; Silverman, GJ; Mannik, M. "Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains." *J Immunol* 1989; 142(8): 2778-83

Schelonka, RL; Zemlin, M; Kobayashi, R; Ippolito, GC; Zhuang, Y; Gartland, GL; Szalai, A; Fujihashi, K; Rajewsky, K; Schroeder, Jr HW. "Preferential use of DH reading frame 2 alters B cell development and antigen-specific antibody production." *J Immunol* 2008; 181(12): 8409-15

Schramm, G; Mohrs, K; Wodrich, M; Doenhoff, MJ; Pearce, EJ; Haas, H; Mohrs, M. "Cutting Edge: IPSE/alpha-1, a Glycoprotein from *Schistosoma mansoni* Eggs, Induces IgE-Dependent, Antigen-Independent IL-4 Production by Murine Basophils In Vivo." *J Immunol* 2007; 178(10):6023-7

Schramm, G; Falcone, FH; Gronow, A; Haisch, K; Mamat, U; Doenhoff, MJ; Oliviera, G; Galle, J; Dahinden, CA; Hass, H. , Molecular Characterization of an Interleukin-4-inducing Factor from *Schistosoma mansoni* Eggs." *J Biol Chem* 2003; 278(20):18384-92.

Shinkura, R; Ito, S; Begum, NA; Nagaoka, H; Muramatsu, M; Kinoshita, K; Sakakibara, Y; Hijikata, H; Honjo, T. "Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination." *Nat Immunol* 2004; 5(7): 707-12.

Silverman, GJ. "Human antibody responses to bacterial antigens: studies of a model conventional antigen and a proposed model B cell superantigen." *Int Rev Immunol* 1992; 9(1): 57-78

Snow, RE; Chapman, CJ; Frew, AJ; Holgate, ST; Stevenson, FK. "Analysis of Ig VH region genes encoding IgE antibodies in splenic B lymphocytes of a patient with asthma." *J Immunol* 1995; 154(10): 5576-81

Strunk, RC; Bloomberg, GR. "Omalizumab for asthma." *N Engl J Med* 2006; 354(25): 2689-95.

Tilgner, J; Golembowski, S; Kersten, B; Sterry, W; Jahn, S. "VH genes expressed in peripheral blood IgE-producing B cells from patients with atopic dermatitis." *Clin Exp Immunol* 1997; 107(3): 528-35

Van der Stoep, N; Van der Linden, J; Logtenberg, T. "Molecular evolution of the human immunoglobulin E response: high incidence of shared mutations and clonal relatedness among epsilon VH5 transcripts from three unrelated patients with atopic dermatitis." *J Exp Med* 1993; 177(1): 99-107

Wan, T; Beavil, RL; Fabiane, SM; Beavil, AJ; Sohi, MK. "The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation." *Nat Immunol* 2002; 3(7): 607-8.

Xu, JL; Davis, MM. "Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities." *Immunity* 2000; 13(1): 37-45

Yamada, M; Wasserman, R; Reichard, BA; Shane, S; Caton, AJ; Rovera, G. "Preferential utilization of specific immunoglobulin heavy chain diversity and joining segments in adult human peripheral blood B lymphocytes." *J Exp Med* 1991; 173(2): 395-407

Zemlin M; Hoersch G; Zemlin C; Pohl-Schickinger A; Hummel M; Berek C; Maier RF; Bauer K. "The postnatal maturation of the immunoglobulin heavy chain IgG repertoire in human preterm neonates is slower than in term neonates." J Immunol 2007; 178(2): 1180-8

Zemlin, M; Klinger, M; Link, J; Zemlin, C; Bauer, K; Engler, JA; Schroeder, HW Jr; Kirkham, PM. "Expressed Murine and Human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures." J Mol Biol 2003; 334(4): 733-49

Zemlin, M; Schelonka, RI; Ippolito, GC; Nitschke, I; Pelkonen, J; Rajewsky, K; Schroeder, HW Jr. "Regulation of repertoire development through genetic control of DH reading frame preference." J Immunol 2008; 181(12): 8416-24

Zhang Z; Zemlin M; Wang YH; Munfus D; Huye LE; Findley HW; Bridges, SL; Roth, DB; Burrows, PD; Cooper, MD. "Contribution of Vh gene replacement to the primary B cell repertoire." Immunity 2003; 19(1): 21-31

## 7. Anhang

### 7.1 Tabelle Mäuse

Balb/c wt/wt Milz	Geburt	FACS- Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/CD 19+ (%)	IPSE+/ IgM+ (%)	IPSE+/ CD19+
w1	1. Jul 04	21. Mrz 05	2,47 x 10 <sup>8</sup>	24,7 G/l in 10ml	50,0	6,0	3,8
w2	1. Jan 05	24. Mrz 05	1,31 x 10 <sup>8</sup>	13,1 G/l in 10ml	78,0	7,5	6,0
m1	30. Dez 04	5. Apr 05	1,09 x 10 <sup>8</sup>	10,9 G/l in 10ml	84,0	6,1	3,0
m2	30. Dez 04	7. Apr 05	1,03 x 10 <sup>8</sup>	10,3 G/l in 10ml	90,6	8,0	4,6
w3	30. Dez 04	8. Apr 05	1,64 x 10 <sup>8</sup>	16,4 G/l in 10ml	92,4	8,0	3,8
w4	30. Dez 04	28. Apr 05	1,47 x 10 <sup>8</sup>	14,7 G/l in 10ml	83,4	4,8	2,9
w5	30. Dez 04	29. Apr 05	1,68 x 10 <sup>8</sup>	17,7 G/l in 9,5ml	77,0	5,7	2,6
w6	12. Nov 04	4. Mai 05	1,3 x 10 <sup>8</sup>	13 G/l in 10ml	79,3	3,7	2,7
w8	7. Jan 05	3. Aug 05	1,47 x 10 <sup>8</sup>	14,7 G/l in 10ml	98,0	2,3	2,1
m3	4. Mrz 05	20. Okt 05	5,5 x 10 <sup>7</sup>	5,5 G/l auf 10ml	95,2	2,9	3,2
w7	7. Jan 05	19. Mai 05	1,41 x 10 <sup>8</sup>	14,1 G/l in 10ml	86,9	4,9	2,8
<b>MW</b>					<b>83,2</b>	<b>5,4</b>	<b>3,4</b>
<b>SD</b>					<b>12,4</b>	<b>1,9</b>	<b>1,1</b>

Balb/c wt/wt PCL	Geburt	FACS- Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/CD1 9+	IPSE+/IgM +	IPSE+/ CD19+ (%)
w1	1. Jul 04	21. Mrz 05	1,33 x 10 <sup>7</sup>	2,21 G/l in 6ml	82,0	9,0	3,3
w2	1. Jan 05	24. Mrz 05	2,8 x 10 <sup>6</sup>	0,4 G/l in 7ml		5,3	4,6
m1	30. Dez 04	5. Apr 05	2,4 x 10 <sup>6</sup>	0,4 G/l in 6ml	96,3	2,7	4,5
m2	30. Dez 04	7. Apr 05	10 <sup>6</sup>	0,2 G/l in 5ml	95,7	8,4	5,3
w3	30. Dez 04	8. Apr 05	3,6 x 10 <sup>6</sup>	0,8 G/l in 4,5ml	96,1	5,3	4,7
w4	30. Dez 04	28. Apr 05	7 x 10 <sup>6</sup>	1,4 G/l in 5ml	95,8	5,1	2,6
w5	30. Dez 04	29. Apr 05	6 x 10 <sup>6</sup>	1 G/l in 6ml	96,8	2,9	4,9
w6	12. Nov 05	4. Mai 05					
w8	7. Jan 05	3. Aug 05	1,04 x 10 <sup>7</sup>	1,6 G/l auf 6,5ml	97,8	2,7	2,5
m3	4. Mrz 05	20. Okt 05	5,8 x 10 <sup>6</sup>	0,9 G/l auf 6,5ml	98,1	1,6	1,5
w7	7. Jan 05	19. Mai 05	7,7 x 10 <sup>6</sup>	1,1 G/l in 7ml	95,3	4,5	2,4
<b>MW</b>					<b>94,9</b>	<b>4,8</b>	<b>3,6</b>
<b>SD</b>					<b>4,6</b>	<b>2,3</b>	<b>1,3</b>



Balb/c wt/wt Peyer- Plaques	Geburt	FACS- Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/C D19+	IPSE+/IgM +	IPSE+/C D19+
w1	1. Jul 04	21. Mrz 05	2,37 x 10 <sup>7</sup>	3,38 G/l in 8ml			
w2	1. Jan 05	24. Mrz 05	8 x 10 <sup>6</sup>	0,8 G/l in 10ml	78,0	3,5	1,6
m1	30. Dez 04	5. Apr 05	4 x 10 <sup>6</sup>	0,4 G/l in 10ml	84,3	2,0	1,8
m2	30. Dez 04	7. Apr 05	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,3 G/l in 10ml	76,1	3,6	2,2
w3	30. Dez 04	8. Apr 05	4,4 x 10 <sup>7</sup>	4 G/l in 11ml	77,0	2,0	1,3
w4	30. Dez 04	28. Apr 05	2,1 x 10 <sup>7</sup>	2,1 G/l in 10ml	61,5	2,8	0,9
w5	30. Dez 04	29. Apr 05	1,8 x 10 <sup>7</sup>	1,8 G/l in 10ml	76,5	1,9	1,1
w6	12. Nov 05	4. Mai 05	3,2 x 10 <sup>7</sup>	3,2 G/l in 10ml	57,2	1,6	0,8
w8	7. Jan 05	3. Aug 05	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 G/l auf 10ml	94,9	1,0	1,1
m3	4. Mrz 05	20. Okt 05	4 x 10 <sup>5</sup>	0,4 G/l auf 10ml	89,9	1,9	1,5
w7	7. Jan 05	19. Mai 05	1,5 x 10 <sup>7</sup>	1,5 G/l in 10ml	65,2	2,3	1,5
<b>MW</b>					<b>76,1</b>	<b>2,3</b>	<b>1,4</b>
<b>SD</b>					<b>11,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>

Δ-iD, Milz	Geburt	FACS- Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/CD 19+	IPSE+/IgM +	IPSE+/C D19+
154	10. Mai 05	1. Aug 05	9,9 x 10 <sup>7</sup>	10,4 G/l in 9,5ml	97,5	3,0	2,0
164	10. Mai 05	2. Aug 05	1,01 x 10 <sup>8</sup>	10,7 G/l in 9,5 ml	96,7	4,1	2,8
153	31. Mai 05	5. Aug 05	9,8 x 10 <sup>7</sup>	9,8 G/l in 10ml	89,6	5,3	3,6
171	5. Jun 05	8. Aug 05	9,2 x 10 <sup>7</sup>	9,2 G/l in 10ml	96,0	4,7	3,8
151	31. Mai 05	9. Aug 05	9,9 x 10 <sup>7</sup>	9,9 G/l in 10ml	96,6	2,5	1,5
173	22. Jun 05	15. Aug 05	7 x 10 <sup>7</sup>	7 G/l in 10ml	94,7	4,2	4,3
176	22. Jun 05	18. Aug 05	8 x 10 <sup>7</sup>	8 G/l in 10ml			
178	22. Jun 05	18. Aug 05	6,4 x 10 <sup>7</sup>	6,4 G/l in 10ml	97,2	1,8	1,3
174	22. Jun 05	19. Aug 05	7,5 x 10 <sup>7</sup>	7,5 G/l in 10ml	96,2	3,0	2,6
177	22. Jun 05	19. Aug 05	8,9 x 10 <sup>7</sup>	8,9 G/l in 10ml	95,1	1,3	1,6
<b>MW</b>					<b>95,5</b>	<b>3,3</b>	<b>2,6</b>
<b>SD</b>					<b>2,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>

$\Delta$ -iD, PCL	Geburt	FACS-Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/CD19+	IPSE+/IgM+	IPSE+/CD19+
154	10. Mai 05	1. Aug 05	4,55 x 10 <sup>6</sup>	0,7 G/l in 6,5ml	99,1	3,5	3,0
164	10. Mai 05	2. Aug 05	2,4 x 10 <sup>6</sup>	0,4G/l, 6ml	97,4	1,6	1,8
153	31. Mai 05	5. Aug 05	2,2 x 10 <sup>6</sup>	0,4G/l, 5,5ml	97,0	13,1	12,1
171	5. Jun 05	8. Aug 05	1,8 x 10 <sup>6</sup>	0,3G/l, 6ml	97,4	1,6	2,0
151	31. Mai 05	9. Aug 05	3 x 10 <sup>6</sup>	0,5G/l, 6ml	98,7	1,7	1,7
173	22. Jun 05	15. Aug 05	2 x 10 <sup>6</sup>	0,3 G/l in 6,5ml	97,8	1,5	2,0
176	22. Jun 05	18. Aug 05	2,8 x 10 <sup>6</sup>	0,4 G/l in 7ml			
178	22. Jun 05	18. Aug 05	4,9 x 10 <sup>6</sup>	0,7 G/l in 7ml	96,6	3,0	2,8
174	22. Jun 05	19. Aug 05	2,2 x 10 <sup>6</sup>	0,4 G/l in 5,5ml	95,3		
177	22. Jun 05	19. Aug 05	2,4 x 10 <sup>6</sup>	0,4 G/l in 6ml	98,0	2,3	1,9
<b>MW</b>					<b>97,5</b>	<b>3,5</b>	<b>3,4</b>
<b>SD</b>					<b>1,1</b>	<b>3,7</b>	<b>3,3</b>

$\Delta$ -iD, Peyer-Plaques	Geburt	FACS-Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/CD19+	IPSE+/IgM+	IPSE+/CD19+
154	10. Mai 05	1. Aug 05	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 G/l in 10ml	93,4	1,2	0,8
164	10. Mai 05	2. Aug 05	1,4 x 10 <sup>7</sup>	1,4G/l, 10 ml	89,9	1,1	0,8
153	31. Mai 05	5. Aug 05	1,1 x 10 <sup>7</sup>	1,1G/l, 10 ml	87,5	5,4	2,9
171	5. Jun 05	8. Aug 05	1,4 x 10 <sup>7</sup>	1,2G/l, 11,5 ml	82,2	1,4	1,3
151	31. Mai 05	9. Aug 05	2,6 x 10 <sup>7</sup>	2,6G/l, 10 ml	84,5	0,7	0,4
173	22. Jun 05	15. Aug 05	2 x 10 <sup>6</sup>	0,2 G/l in 10ml	91,3	1,2	0,8
176	22. Jun 05	18. Aug 05	1,5 x 10 <sup>7</sup>	1,5 G/l in 10ml			
178	22. Jun 05	18. Aug 05	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 G/l in 10ml	86,7	1,4	0,5
174	22. Jun 05	19. Aug 05	1,1 x 10 <sup>7</sup>	1,1 G/l in 10ml	81,4	1,5	0,9
177	22. Jun 05	19. Aug 05	9 x 10 <sup>6</sup>	0,9 G/l in 10ml	89,9	0,6	0,7
<b>MW</b>					<b>87,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,0</b>
<b>SD</b>					<b>3,9</b>	<b>1,4</b>	<b>0,7</b>

$\Delta$ -RF2, Milz	Geburt	FACS-Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/CD19+	IPSE+/IgM+	IPSE+/CD19+
160	29. Mai 05	10. Aug 05	5,8 x 10 <sup>8</sup>	5,8 G/l in 10ml	97,6	3,2	2,6
172	10. Jun 05	15. Aug 05	9 x 10 <sup>6</sup>	9 G/l in 10 ml	97,0	3,3	2,6
182	21. Jun 05	17. Aug 05	3,8 x 10 <sup>7</sup>	3,8 G/l in 10ml	97,0	3,4	2,4
183	21. Jun 05	17. Aug 05	6,6 x 10 <sup>7</sup>	6,6 G/l in 10ml	96,3	5,9	2,5
210	10. Jul 05	19. Okt 05	8,9 x 10 <sup>7</sup>	8,9 G/l in 10ml	97,8	2,3	2,2
159	29. Mai 05	11. Aug 05	7,7 x 10 <sup>7</sup>	7,7 G/l in 10ml	94,3	3,9	3,1
155	29. Mai 05	25. Jul 05	1,24 x 10 <sup>8</sup>	12,4 G/l in 10ml	81,0	3,9	2,7
158	29. Mai 05	27. Jul 05	1,01 x 10 <sup>8</sup>	10,1 G/l in 10ml	83,9	5,4	3,8
156	29. Mai 05	28. Jul 05	1 x 10 <sup>8</sup>	10 G/l in 10ml	95,8	5,6	6,1
157	29. Mai 05	29. Jul 05	1,01 x 10 <sup>8</sup>	10,1 G/l in 10ml	97,3	4,2	3,4
<b>MW</b>					<b>93,8</b>	<b>4,1</b>	<b>3,1</b>
<b>SD</b>					<b>5,8</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>

$\Delta$ -RF2, PCL	Geburt	FACS-Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/CD19+	IPSE+/IgM+	IPSE+/CD19+
160	29. Mai 05	10. Aug 05	4,55 x 10 <sup>6</sup>	0,7G/l, 6,5ml	98,2	8,4	6,4
172	10. Jun 05	15. Aug 05	2,6 x 10 <sup>6</sup>	0,4G/l, 6ml	98,6	1,9	2,0
182	21. Jun 05	17. Aug 05	2,75 x 10 <sup>6</sup>	0,5G/l, 5,5ml	98,5	1,9	2,0
183	21. Jun 05	17. Aug 05	2,75 x 10 <sup>6</sup>	0,5G/l, 5,5	97,4	1,5	1,6
210	10. Jul 05	19. Okt 05	3,5 x 10 <sup>6</sup>	0,5G/l, 7ml	97,5	2,3	2,1
159	29. Mai 05	11. Aug 05	2,2 x 10 <sup>6</sup>	0,4 in 5,5ml	98,1	4,0	3,6
155	29. Mai 05	25. Jul 05	4,5 5x 10 <sup>6</sup>	0,7 G/l in 6,5ml	97,1	5,0	2,9
158	29. Mai 05	27. Jul 05	4,9x 10 <sup>6</sup>	0,7 G/l in 7ml	96,8	2,8	1,8
156	29. Mai 05	28. Jul 05	2,4 x 10 <sup>6</sup>	0,4 G/l in 6 ml	99,0	5,7	6,0
157	29. Mai 05	29. Jul 05	4,9 x 10 <sup>6</sup>	0,7 G/l in 7ml	99,2	2,6	2,6
<b>MW</b>					<b>98,0</b>	<b>3,6</b>	<b>3,1</b>
<b>SD</b>					<b>0,8</b>	<b>2,1</b>	<b>1,6</b>

$\Delta$ -RF2, Peyer- Plaques	Geburt	FACS- Datum	Zellzahl gezählt	CD19+/ges (%)	IgM+/CD1 9+	IPSE+/IgM +	IPSE+/C D19+
160	29. Mai 05	10. Aug 05	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2 G/l in 10ml	92,9	4,7	5,5
172	10. Jun 05	15. Aug 05	1 x 10 <sup>6</sup>	1 G/l, 10 ml	89,6	1,8	1,6
182	21. Jun 05	17. Aug 05	7 x 10 <sup>6</sup>	0,7G/l, 10 ml	88,9	1,4	1,6
183	21. Jun 05	17. Aug 05	1,4 x 10 <sup>7</sup>	1,4 G/l, 10 ml	85,4	2,1	1,7
210	10. Jul 05	19. Okt 05	1,9 x 10 <sup>7</sup>	1,9 G/l, 10 ml	92,6	0,7	0,5
159	29. Mai 05	11. Aug 05	1,4 x 10 <sup>7</sup>	1,4 G/l, 10 ml	91,6	4,1	3,7
155	29. Mai 05	25. Jul 05	1,6 x 10 <sup>7</sup>	1,6 G/l in 10ml	57,5	1,8	1,0
158	29. Mai 05	27. Jul 05	1 x 10 <sup>7</sup>	1 G/l, 10 ml	83,1	2,4	1,4
157	29. Mai 05	29. Jul 05	9 x 10 <sup>6</sup>	0,9 G/l in 10ml	94,6	4,8	3,8
<b>MW</b>					<b>86,2</b>	<b>2,6</b>	<b>2,3</b>
<b>SD</b>					<b>10,7</b>	<b>1,4</b>	<b>1,5</b>

## **7.2 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Proteintertiärstruktur eines humanen IgG-Moleküls	Seite 08
Abbildung 2	Prinzip der $V_H$ - $D_H$ - $J_H$ -Umlagerung der schweren Kette des Immunglobulins	Seite 10
Abbildung 3	Bindung von IPSE an verschiedene Immunglobulin-klassen und -unterklassen	Seite 21
Abbildung 4	Sensibilisierung nach Protokoll 1	Seite 32
Abbildung 5	Sensibilisierung nach Protokoll 2	Seite 33
Abbildung 6	Exemplarische FACS-Analyse am Beispiel der Peyer-Plaques	Seite 40
Abbildung 7	Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent Wt	Seite 41
Abbildung 8	Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent $\Delta$ -iD	Seite 42
Abbildung 9	Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent $\Delta$ -RF2	Seite 44
Abbildung 10	Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent Milz	Seite 46
Abbildung 11	Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent PCL	Seite 47
Abbildung 12	Anteil IPSE-bindender Zellen in Prozent Peyer-Plaques	Seite 48
Abbildung 13	IPSE-IgM/Gesamt-IgM-Quotient	Seite 52
Abbildung 14	IPSE-IgG1/Gesamt-IgG1-Quotient	Seite 54

### **7.3 Publikationen**

#### **Vorträge bzw. Poster**

Julia D. Michels, Sebastian Kerzel, Helmut Haas<sup>1</sup>, Rolf F. Maier und Michael Zemlin. „Das „Interleukin-4-induzierende Prinzip“ von *Schistosoma mansoni*-Eiern (IPSE) ist ein B-Zell-Superantigen.“

59. Jahrestagung der Süddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin gemeinsam mit der Süddeutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie 19.-21. März 2010 in Marburg

### **7.4 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität zu Marburg an der Lahn zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „IPSE: Klassisches Antigen oder Superantigen?“ in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin unter Leitung von Prof. Dr. med. Rolf. F. Maier mit Unterstützung durch PD Dr. med. Michael Zemlin ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Mannheim, den 29.09.2010

## **7.5 Verzeichnis der Akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Medizin waren die Damen und Herren

### **In Marburg:**

Achilles, Amon, Arnold, Aumüller, Aziz, Barth, Basler, Bauer, Baum, Beato, Becker, Berendes, Berger, Bergmann, Berndt, Bernhardt, Brilla, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Effendy, Eisele, Elsässer, Engenhardt-Cabille, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Friedrich, Frustorfer, Fuhmann, Gemsa, Gente, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Gotzen, Graul, Grimm, Griss, Grünwald, Grundner, Gudermann, Hackenberg, Hamer, Happle, Hadewig, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Hellwig, Hemmer, Hering, Herrler, Hess, Herzum, Heufelder, Hildebrandt, Hilgermann, Hofmann, Huffmann, Jackowski-Dormann, Jacob, Jeck, Joseph, Jungclas, Kaffarnik, Kann, Karlson, Katschinski, Kern, Kim-Berger, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Klaus, Knoll, Koch, Köhler, Kömhoff, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhn, Kuni, Lammel, Lang, Lange, Lauer, Lehmann, Legrum, Lengfeld, Lennartz, Leonhardt, Lill, Lippert, Liss, Löffler, Lohoff, Lorenz, Lotzmann, Ludwig, Lürs, Lütcke, Maier, Maisch, Mann, Mennel, Moll, Moosdorf, Mooy de, Mueller, Müller, Mutters, Netter, Neubauer, Neurath, Niemeyer, Nies, Niessing, Noll, Nüsing, Oepen, Oertel, Penzel, Peter, Petermann, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Radsak, Rehder, Reinalter, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupec, Rupp, Schachtschabel, Schäfer, Schepelmann, Schiff, Schleyer, Schlingmann, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider, Schreiber, Schueffel, Schuermann, Schumacher, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Stachniss, Steiniger, Stiletto, Stinner, Stempel, Sturm, Sure, Suske, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weber, Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, Wichert v., Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Wulf, Zielke

### **In Frankenberg:**

Dylla, Hüttich, Kohler, Sander, Schmid, Wagner, Weise



## **7.6 Curriculum vitae**

### ***Persönliche Daten***

Name:	Michels
Vorname:	Julia Dorothea
Anschrift:	Kußmaulstr. 13, 68167 Mannheim
Telefon:	0621 9819052
E-Mail:	Julia_Michels@gmx.de
Geburtsdatum / -ort:	08.10.1981, Marburg
Familienstand:	ledig

### ***Schulbildung***

1988 - 1992:	Grundschule, Neustadt
1992 - 2001:	Schwalmgymnasium, Schwalmstadt-Treysa
2001:	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,0)

### ***Hochschulbildung***

10 / 2001	Beginn des Medizinstudiums an der Philipps-Universität Marburg
09 / 2003:	Ärztliche Vorprüfung (Note: sehr gut)
11 / 2007:	Abschluss: Medizinisches Staatsexamen (Note: gut)

***Famulaturen***

03 / 2004:	Chirurgie am Kreiskrankenhaus Alsfeld
08 / 2004:	Internistische Praxis Dr. med. Weyhmann in Stadtallendorf
09 / 2004:	Anästhesie und Intensivmedizin am Diakoniekrankenhaus Marburg-Wehrda
09 / 2005:	Gynäkologie / Geburtshilfe an der UCPel (Universidade Católica de Pelotas), Pelotas, Brasilien

***Praktisches Jahr***

21.8.2006 – 10.12.2006	Innere Medizin im akademischen Lehrkrankenhaus Frankenberg
11.12.2006 – 04.02.2007	Unfallchirurgie im akademischen Lehrkrankenhaus Frankenberg
05.02.2007 – 01.04.2007	Allgemeinchirurgie im St. John's Medical College, Bangalore, Indien
02.04.2007 – 22.07.2007	Neurologie am Klinikum der Philipps - Universität, Marburg

***Promotion***

2005-2009:	Neonatologisches Labor der Philipps-Universität Marburg, Thema: „IPSE: Klassisches Antigen oder Superantigen?“
------------	--

***Beruflicher Werdegang:***

Seit 2008                      Weiterbildung zur Fachärztin für Innere Medizin und  
Pneumologie an der Universitätsmedizin Mannheim

***Berufliche Nebentätigkeiten***

2001 - 2003:                      Aushilfe als Postzusteller bei der Deutschen Post  
Stadtallendorf

2002 - 2004:                      Aushilfe als Pflegekraft in den Schwalm – Eder -  
Kliniken

seit 2004:                      Dozent und Autor für Physiologie und Innere Medizin  
bei Medi-Learn, Marburg

***Fremdsprachen***

Englisch, Französisch, Spanisch, Portugiesisch, (Japanisch, Grundkenntnisse)

***Hobbys***

Klavier, Gitarre, Gesang, Schwimmen, Volleyball, Kickboxen

## **7.7 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Rolf F. Maier für die Vermittlung des Promotionsthemas und die Unterstützung bei Durchführung der Arbeit.

Herrn PD Dr. med. Michael Zemlin danke ich für die intensive Einarbeitung und Betreuung dieser Arbeit. Seine Motivation und geduldige Unterstützung trugen viel zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Ich danke Herrn Dr. med. Sebastian Kerzel für seine Unterstützung und Hilfe, insbesondere bei der Methodenetablierung des ELISA.

Sabine Jennemann und Regina Stöhr danke ich für die Unterstützung bei praktischen Tätigkeiten und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung mein Studium und meine Dissertation sicherlich nicht möglich gewesen wären.